THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Gènes, Cellules et Développement*

Présentée et soutenue par *Isabelle Fernandes*
Le *28 Septembre 2009*

Titre : *Étude fonctionnelle des protéines à domaine Zona Pellucida au cours de la morphogenèse épidermique embryonnaire chez la Drosophile.*

JURY
Pr Pierre-Emmanuel Gleizes, Président
Pr Michel Labouesse, Rapporteur
Pr Bertrand Mollereau, Rapporteur
Dr Bernard Moussian, Rapporteur
Pr Markus Affolter, Examinateur
Pr Paul M. Wassarman, Examinateur
Dr Serge Plaza
Dr François Payre

Ecole doctorale : *Biologie, Santé et Biotechnologie*
Unité de recherche : *Centre de Biologie du développement*
Directeur(s) de Thèse : *Dr Serge Plaza*
Rapporteurs : *Pr Michel Labouesse*
Pr Bertrand Mollereau
Dr Bernard Moussian

Je n'ai pas dit que ce serait facile, Néo. J'ai juste dit que ce serait la vérité.
Matrix, 1999.

REMERCIEMENTS

Eh bien voilà nous y sommes ! Après 5 ans… eh oui déjà 5 ans ! Je dois partir et cette thèse vient achever, en beauté j'espère, toutes ces dernières années de travail…Je l'ai rédigé comme mon cahier de manip…version confession intime…

Tout d'abord je souhaiterais remercier l'ensemble de membre du jury d'avoir accepter de juger ce travail.

Et avant d'entamer les choses sérieuses, je tenais à remercier un certaines nombres de personnes sans lesquelles tous ce travail n'aurait jamais pu être fait ou alors avec beaucoup plus de difficultés.

Je vais commencer par toutes les personnes qui travaillent dans l'ombre, ou plutôt ici dans les sous-sols. Il y aurait pas mal de choses à dire sur ces sous-sols mais ce n'est pas le propos de ce paragraphe. Alors je commencerais tout d'abord par remercier Julien et Fred, sans qui au quotidien il nous serait impossible d'entretenir nos stocks, lancer les croisements, récolter des embryons… mais aussi utiliser des tubes eppendorf et des cônes stériles…en bref tout simplement travailler. Merci les garçons de toujours veiller depuis les tréfonds de notre sous-sol à nous fournit ce dont nous avons besoin. Merci aussi à Daniel, de gérer dans l'ombre les achats de tout ce matériel, mais aussi de gérer nos absences et notre manques de ponctualité dans les commandes, merci d'avoir toujours su trouver une solution à mes petits soucis…

Lors de mon entretien d'entrée dans le M2R, on m'a demandé quel stage m'intéressait et pourquoi. Ma réponse en a fait sourire plus d'un, et sur le moment je n'ai pas vraiment compris pourquoi, mais je voulais travailler avec Serge et faire de l'imagerie. Et je n'ai pas été déçue ! Alors bon ! à la base ça n'a pas été évident. Au cours du M2R, j'ai fais trois images au confocal avec l'assistance de Serge et puis c'est tout… beaucoup d'images en contraste de phase, j'en ai vu des préparations de cuticule, oh oui ! Bref aujourd'hui ça me semble peu stimulant mais déjà ces premières acquisitions m'ont donné le goût de faire de belles images. A la fin de ma première de thèse j'ai eu l'opportunité de partir à Bâle, dans le laboratoire de Markus Affolter, pour bénéficier d'une formation en microscopie électronique (EM). Alors merci à Markus, de m'avoir accueilli pendant deux mois dans ton labo, de m'avoir permis d'accéder à un service de très haute qualité et de m'avoir permis de rencontrer Ursula et Marcel qui tout deux m'ont été d'une grande aide dans l'avancée de mon projet de caractérisation phénotypique (et hop une premier gros mot !). Une autre chose pour laquelle je tenais absolument à remercier Markus c'est de m'avoir présenté Paul Wassarman. Oui, lorsque j'ai raconté ma rencontre à la plupart de mes amis, ils m'ont prise pour une hystérique, mais quand même c'est quelque chose de rencontrer au hasard d'un couloir l'homme qui à découvert les protéines à domaine Zona Pellucida et qui depuis 30 ans déjà découpe ces protéines pour comprendre comment elles fonctionnent ! C'est d'abord surprenant puis intimidant, surtout quand Markus m'annonce que je peux déjeuner avec lui et lui parler de mon projet ! Moi petite étudiante en 1ère année de thèse ?! Non j'y crois pas !!! Et puis si c'est vrai ! Alors merci à Mr Wassarman, enfin Paul, d'avoir accepté de me rencontrer alors que vous étiez en vacances, de déjeuner en m'écoutant parler de mon projet avec enthousiasme, d'après Markus, ou plutôt avec beaucoup de stress et le débit impressionnant qui va avec. C'était juste magique !

Me voilà formée en microscopie électronique et toute heureuse de ma rencontre avec ***Le Mr*** *des protéines ZPD… mais surtout me voilà de retour à Toulouse où maintenant il va falloir tout mettre en œuvre pour faire de l'EM. Si je dois être de fière d'un détail en particulier par rapport à mon travail, c'est d'avoir réussit à obtenir des images d'EM d'aussi bonne qualité qu'à Bâle ! Cela a été plus qu'épique comme entreprise mais j'ai trouvé toute*

l'aide dont j'avais besoin et surtout des personnes compétentes et disponibles. Je voudrais tout d'abord remercier Isabelle et Bruno, au CMEB, qui m'ont beaucoup aidé pour la microscopie à balayage. Grâce à eux j'ai pu préparer mes échantillons et trouver le microscope de mes rêves, en TEMSCAN… et c'est la que ça se complique puisqu'il est situé dans un autre service, à un autre endroit dans le campus… Mode d'emploi pour obtenir une belle image en 3DM d'un poil de ventre de bébé mouche à Toulouse : tout d'abord préparer ces bébés mouches (important), ensuite direction la faculté de Médecine (CMEB) pour les amener à Isabelle qui va se charger de leur faire un point critique (houlala ! encore un truc compliqué), ça se passe pendant la nuit car c'est assez long. Le lendemain, il faut retourner au CMEB pour poser les petits bébés sur plot métallique et retraverser le campus pour aller en TEMSCAN, ou Stéphane m'attends pour métalliser mon échantillon et faire des belles images avec son gros microscope… Bref une belle balade ! Merci donc Stéphane qui manipule le micro et prend les images. C'était la première fois qu'il travaillait sur du vivant (bon ok mes embryons sont un peu morts quand ils sont dans le micro mais d'habitude il regarde des poudres ou trucs du genre…bizarre). Il a donc été rapidement confronté à mon obsession des ***poils du ventre*** *(oui spécifiquement du ventre), et il a du supporter de m'entendre pendant plusieurs heures lui dire : « non pas celui-là, on ne voit pas le ventre » « non pas celui-ci il est tout sale ». Bref merci Stéphane de m'avoir supporté dans ma recherche du* ***poil parfait*** *!*

Le balayage (malgré me origine, rien à voir avec le ménage je suis toujours dans la microscopie) réglé, je me suis penchée sur la transmission (toujours en microscopie, pas celle de la voiture). Merci à Pierre-Emmanuel pour tous ces conseils précieux mais aussi parce qu'il a acheté le second microscope de mes rêves, oui je rêve de microscopes mais aussi parfois d'embryons, en optique ça s'appelle une persistance rétinienne et en psychiatrie ça s'appelle une hallucination. Merci à Nacer et Stéphanie, qui m'ont accompagné tout au long de projet de localisation des ZPD et de caractérisation des phénotypes des mutants et qui ont du eux aussi supporté de m'entendre me plaindre en permanence de mes embryons, tout simplement parce que je ne voyais pas leurs poils du ventre, de grands moments… mais je crois avoir conquis tout le monde dans ma recherche du ***poil parfait*** *!*

Alors le poil en EM c'est sympa mais ça manque un peu de couleur…et je crois que la suite de thèse vous le démontrera !

Merci à Brice et en particulier à Aurélie pour toute leur aide en microscopie confocale. Après des mois production de peptides (pas drôle), d'attente pour l'immunisation (à ce propos je tiens à rendre hommage à l'un des lapinous mort sans pouvoir servir la science après l'injection de Trynity un week-end de solitude) et de tests, j'ai pu localiser 4 des protéines préférées, avec de belles couleurs tout comme j'aime pour enfin établir le modèle du poil arc-en-ciel ! Aurélie a même mis mes poils préférés en 3DM, merci.

Mais tout ça n'aurait jamais été possible sans financement, donc merci Lucas de m'avoir accordé ta confiance et ton financement pour mener à bien ce projet, qui n'a strictement rien à voir avec l'hématopoïèse, mais qui je le sais t'a convaincu. Pour te citer après ma 1ère réunion d'équipe sur mon projet de thèse : « un poil tordu est un poil tordu quelque soit le sens dans lequel il est tordu ». Merci, tu as su trouver les mots justes pour m'obliger à me battre et à défendre ce projet.

Bien sûr un projet de thèse ça ne décide pas tout seul, j'ai toujours été entouré par une équipe pour avancer au quotidien. Merci à Jennifer, qui nous déjà quitté, de m'avoir accompagné dans la découverte du monde merveilleux de la drosophile mais aussi pour nos nombreuses discussions rugbystiques et sa foi aveugle dans les victoires du Stade Toulousain. Bon courage à Emilie, Delphine et Ahmad, les nouveaux entrants de l'équipe, une petite pensée toute particulière pour Emilie qui va devoir me remplacer auprès de Serge…occupe toi bien de lui, je te le confie ! Je voudrais aussi faire un remerciement tout particulier à

Hélène F., qui depuis quelques mois maintenant supporte ma mauvaise humeur permanente, la rédaction me réussit assez mal coté épanouissement personnel. Merci d'avoir toujours été là pour entendre mes plaintes et mes « coups de gueule », merci d'avoir su garder ton sourire et souvent même d'avoir ri pour faire décompresser dans les moments les plus difficiles. J'ai trouvé en toi des blagues aussi douteuses que les miennes, et je garderai pour toujours l'image de cet ours polaire apparaissant dans mon tube eppendorf. Je ne serais pas là pour te rendre la pareille, mais depuis mon Canada lointain c'est promis, je penserais à toi. Merci à Yvan (mon robot in situ (HIS)) pour toute l'aide qu'il a pu m'apporter et surtout l'acharnement qu'il a montré pour réaliser ces fameuses HIS fluo. Merci pour toute l'aide précieuse que tu as su m'amener dans la préparation des TPs, le matériel, les échantillons, le rangement impeccable des salles. Merci à mon Phiphi pour son soutien psychologique tout au long de ces 5 années, même si parfois entre nous il y a eu des désaccords, non, non, nous sommes absolument aussi têtus, je préfère dire obstinés, l'un que l'autre. Merci d'avoir toujours assuré une playliste d'exception dans le labo. Je souhaitais aussi un grand merci à Pierre, qui lui me supporte depuis bien plus longtemps encore (la licence soit 7ans). Merci pour ta grande disponibilité au quotidien, pour l'aide précieuse en bioinformatique, grâce à toi je ce mot là ne m'apparaît plus comme étant un gros mot. Merci de m'avoir fait confiance en tant que monitrice et de m'avoir ainsi donné l'opportunité de passer de l'autre côté du miroir, pas facile de se retrouver face à une vingtaine d'étudiants qui ne sont pas toujours là pour apprendre. Merci à Hélène C., c'est grâce à toi que j'ai partir à Bâle pour faire ma formation en EM et que cette histoire à commencé, merci de poursuivre mon travail et de lui donner une suite pour qu'il ne reste pas à moisir au fin fonds d'un tiroir. Je souhaiterais aussi remercier François d'avoir fait confiance à Serge et de m'avoir donné l'opportunité de faire ma thèse dans ton équipe. Merci également pour ta volonté incessante de tirer le meilleur de chacun de nous, certes parfois avec de manière désagréable mais malgré tout efficace. Merci encore pour ma palette graphique, ça m'a facilité grandement le travail ces derniers temps. Par contre, depuis que je te réclamais une loupe fluo, il aura fallu attendre que je parte pour qu'elle soit enfin livrée, je suis totalement dépitée ! Enfin bien sûr, je tenais à remercier plus particulièrement Serge. En effet, c'est lui qui a du m'encadrer au quotidien, et croyez moi, ça n'a pas toujours été facile. Alors merci Serge d'avoir cru en moi, de m'avoir soutenu, conseillée, de m'avoir aidé à développer mon sens critique (un peu trop parfois), et de m'avoir formée aux techniques de biologie moléculaire…Je pars en ayant reçu la meilleur formation qu'un étudiant puisse rêver d'avoir, si on me demandait aujourd'hui de revenir en arrière je ne changerais pas d'avis. J'ai toujours dit que c'était moi qui t'avais choisi et non l'inverse et je ne regrette toujours pas ce choix. Pardon pour les angoisses et les crises de « pepitos » aigues, mais je suis comme ça, franche et entière, j'espère que tu t'en souviendras comme de qualités. J'aurais encore beaucoup à dire mais tu le sais déjà…

Pour finir avec la science à proprement parler, merci à l'ensemble des « CBDistes » passés et présents, pour avoir toujours su créer une ambiance particulière dans cet institut. Je voudrais en citer quelques uns qui sont devenus spéciaux (et spatiaux) : Nicolas et Rami (pour les discussions de couloir et les cafés amicaux), Jon (parce t'es toi !), Myriam (prends de la goutte, il s'appelle ploc) Justine et Amélie (parce que votre sagesse à su me donner le recul nécessaire pour ne pas imploser ces derniers mois), Aurélie (ta BD sera bientôt sous verre, merci) Karène (pour nos petits moments shopping)…et vous tous membres du CBD.

Une petite pensée pour Bruno Glise, qui a su rendre la Biologie du Développement attractive et intéressante à mes yeux et sans qui je ne serais sûrement pas là cette année.

Bien sûr je ne peux achever ces remerciements sans parler de mes amis. Merci à vous tous scientifiques ou non de m'avoir soutenu tout au long de mes longues études, parfois voire souvent très prenantes. Merci à tous les membres la com' fête d'Alpha-T, Magali, Guillaume, Tophe, Simon, Alex, Cédric, Allan, Coco, Camille, Marie, … et bien sûr Eléonore et Flavie qui sont bien plus que des camarades de fêtes, des vraies amies. Merci à toi Flalife, depuis Bristol pour ton assistance dépannage à distance et pour toute l'amitié que tu m'as donné et que tu me donnes encore, merci de m'avoir écouté parler de mes poils avant les grandes échéances. Elé, il y tellement de choses à dire, merci d'avoir partagé mon quotidien pendant un an, je ne suis jamais senti aussi drôle, je me suis même convaincue d'avoir un vrai potentiel comique ! Merci pour ton soutien au cours des derniers jours de rédaction, merci d'avoir passé une nuit blanche avec moi au CBD (assez lugubre comme endroit en pleine nuit). Je souhaitais aussi remercier mes amis « non scientifiques » pour leur soutien, même si parfois vous ne me compreniez pas, j'ai toujours pu compter sur chacun de vous pour m'écouter, me changer les idées, être là tout simplement, et en particulier petit Pierre.

Et pour finir ce long monologue qui je suis sûre commence à vous ennuyer je voudrais remercier ma famille et ma belle-famille pour tout les moments de détente que j'ai pu partager avec chacun de vous, pour votre patience et votre intérêt porté à mon travail difficilement compréhensible. Geneviève et Yannick, merci de m'avoir accueillie si chaleureusement dans votre famille, je promets de prendre bien soin du petit. Grand Frère, merci de toujours, toujours avoir été là pour moi, de ne jamais m'avoir jugée, de m'avoir soutenu sans me même pouvoir me comprendre pourtant. Merci à toi Florent, sans qui cette dernière année aurait été tout simplement impossible. Merci de m'avoir soutenu au quotidien, d'avoir supporté mes crises d'angoisses existentielles, mes délires les plus fous dans les moments où mon cerveau avait totalement déconnecté. Merci aussi de m'avoir donné le courage de partir tenter notre chance à Montréal, et merci d'être toi, l'homme le plus calme et le plus patient du monde.

Papa, Maman, merci de m'avoir soutenu tout au long de mes études, et pourtant, qu'est-ce qu'elles ont été longues ! Merci de n'avoir jamais douté de moi ! ***Cette thèse est pour vous.***

AUTEUR : Isabelle Fernandes

TITRE : Etude fonctionnelle des protéines à domaine Zona Pellucida au cours de la morphogenèse épidermique embryonnaire chez la Drosophile.

DIECTEUR DE THESE : Dr Serge Plaza

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : 28 Septembre 2009 à 13h30

RESUME

La morphogenèse consiste en l'acquisition de la forme tridimensionnelle des cellules et des tissus au cours de l'embryogénèse. Nous abordons cette question par l'étude de la morphogenèse des cellules épidermiques embryonnaires de drosophile. La différenciation de l'épiderme est gouvernée par des cascades de régulation transcriptionnelle, conduisant à une morphologie stéréotypée du tissu, alternant des cellules lisses et des cellules formant des extensions apicales (trichomes). Les travaux de l'équipe ont établi que le facteur de transcription Shavenbaby (Svb) joue un rôle clé dans la détermination des cellules formant des trichomes au cours du développement. Afin de comprendre comment les cellules embryonnaires acquièrent cette forme spécifique, mon objectif a été de décrypter les mécanismes moléculaires responsables de la différenciation morphologique de l'épiderme de drosophile.

Dans une première partie, nous nous sommes attachés à identifier les gènes dont l'expression est spécifiquement dirigée par le facteur Svb dans les cellules à trichomes. Nous mettons en évidence que la formation des trichomes nécessite en réalité la régulation transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes dont les fonctions individuelles contribuent à la réorganisation du cytosquelette, mais aussi à celle des compartiments membranaires et extracellulaires.

Nous avons ensuite exploré les mécanismes moléculaires responsables de l'expression spécifiques de ces effecteurs cellulaires. Nous montrons que Svb contrôle directement l'expression de plusieurs effecteurs, en se fixant sur les régions cis-régulatrices (CRM) de ces gènes. Par la combinaison d'approches fonctionnelles et bio-informatiques, nous avons identifié certains de ces CRM et recherché les éléments individuels impliqués dans leur fonction *in vivo*. Nos résultats constituent un des rares cas de décryptage des mécanismes régulant la transcription d'effecteurs du changement de forme cellulaire.

Enfin, la partie majeure de mes travaux de thèse a été dévolue à l'analyse fonctionnelle du rôle d'une famille de protéines de la matrice extracellulaire apicale, dans la morphogenèse des cellules épidermiques. Ces protéines sont caractérisées par un domaine extracellulaire, le Zona Pellucida Domain (ZPD). Nous montrons qu'un ensemble de huit protéines ZPD est nécessaire à la réorganisation localisée de l'architecture cellulaire. Malgré la similitude de leur domaine ZP, chaque protéine présente une fonction spécifique pour organiser l'interaction locale entre le compartiment membranaire apical et la matrice extracellulaire, et ainsi sculpter la forme des extensions cellulaires. Ces résultats révèlent pour la première fois l'existence d'une sous-compartimentalisation fonctionnelle du domaine apical. Ils établissent aussi l'importance de la variation locale de la composition de la matrice extracellulaire apicale pour contrôler le changement de la forme des cellules au cours du développement.

MOTS-CLES : morphogenèse cellulaire, épiderme, matrice extracellulaire, polarité

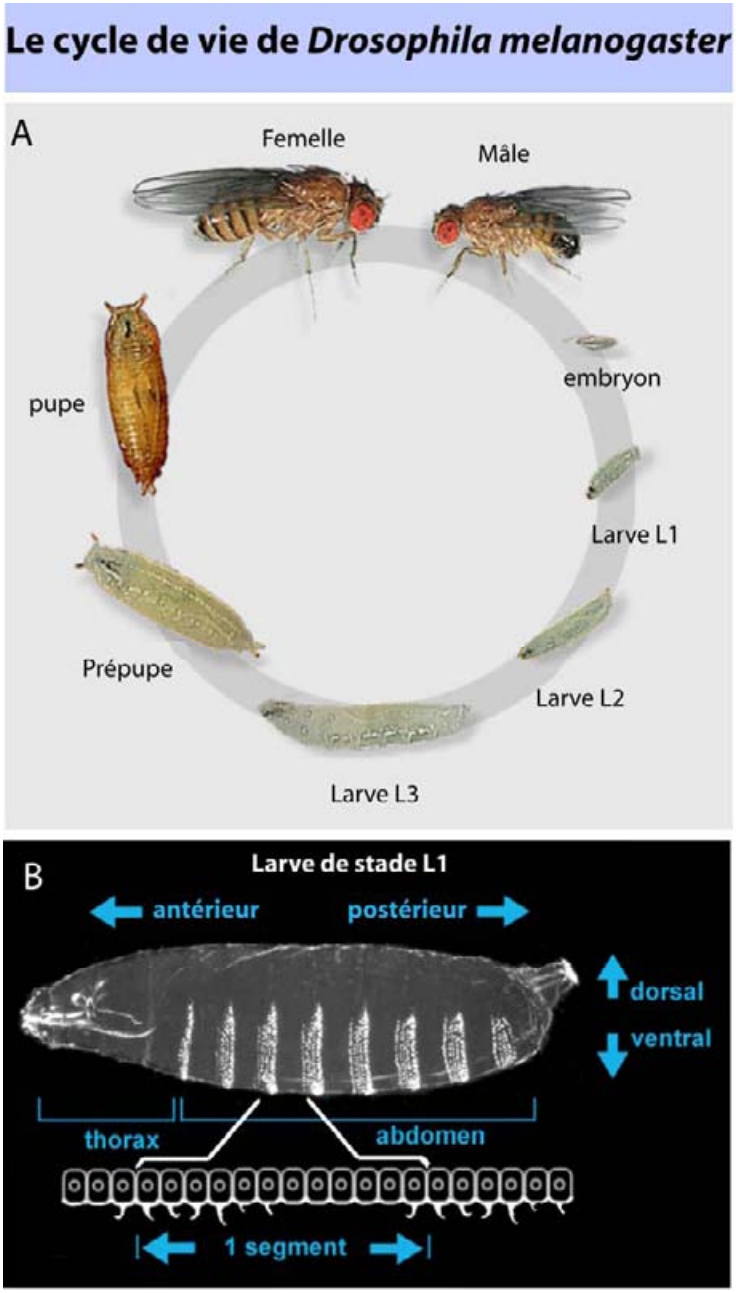
DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Gènes, Cellules et Développement

SOMMAIRE

INTRODUCTION 9
1. Régulation de la mise en place du patron des trichomes 11
1.1 Etablissement des grands axes de l'embryon 11
a) Définition de l'axe Antéro-postérieur (A/P) 12
b) Définition de l'axe dorso-ventral 12
1.2 Formation et morphogenèse générale du tissu épidermique. 13
1.3 Définition des compartiments cellulaires au sein du tissu : la segmentation. 14
a) Les acteurs de la polarité segmentaire. 15
b) Mise en place d'un centre organisateur 16
c) Spécification des différents destins cellulaires. 16
2. Les cellules épidermiques et la mise en place de leur polarité. 18
2.1 Définition de la polarité apico-basale des cellules 18
a) Du blastoderme syncytial au blastoderme cellulaire. 18
b) Formation de la *zonula adherens* : mise en place de la polarité A/P. 19
c) Maturation des complexes jonctionnels : établissement d'une barrière étanche. 21
2.2 L'épiderme et la sécrétion de la cuticule : une barrière protectrice de l'insecte. 22
a) L'épiderme : un organe de sécrétion. 22
b) Formation de la cuticule 23
c) Les voies de sécrétion apicale. 25
3. Shavenbaby : le déterminant « ultime » de la morphogenèse cellulaire épidermique. 26
3.1 Mécanismes cellulaires de la formation des trichomes 26
3.2 Régulateurs du cytosquelette dans la forme apicale des cellules à trichomes 27
3.3 Shavenbaby, un niveau supplémentaire de régulation transcriptionnelle. 28
RESULTATS 32
I. Les cibles de Svb 33
***RESUME* 34**
***DISCUSSION* 48**
II. La régulation des gènes cibles de Svb. 51
***INTRODUCTION* 52**
***RESULTATS* 54**
1) Cibles directes du facteur Svb dans l'épiderme. 54
a) M est une cible directe de Svb : conservation évolutive du motif Ovo. 54
b) Les régulateurs de l'actine : *singed* et *shavenoïd* 55
2) Prédiction et test *in vivo* des CRM liées par Svb. 56
3) Modélisation des CRMs : vers l'identification de nouvelles cibles. 58
***DISCUSSION* 60**
III. Les Protéines à domaine Zona Pellucida dans l'architecture de la denticule.. 63
***RESUME* 64**
***DISCUSSION* 116**
IV. M : paradoxe d'une diffusion. 125
***INTRODUCTION* 126**
***RESULTATS* 128**
1) Min diffuse et se relocalise précisément sur la denticule. 128
2) Découplage des fonctions de M : ancrée versus diffusible 129
a) Fonction du domaine transmembranaire 129
b) M ancrée versus M diffusible 129
3) Fonction de M chez l'adulte 130

a) Sauvetage et diffusion 130
b) Fonction du domaine transmembranaire 131
DISCUSSION **..... 132**
CONCLUSION et PERSPECTIVES 136
1. Régulation transcriptionnelle de la différenciation terminale 137
2. Des modules de différenciation sont-ils réutilisés au cours du développement ? ... 139
3. Analyse in vivo des fonctions et de la régulation des protéines ZPD 142
REFERENCES 145

INTRODUCTION



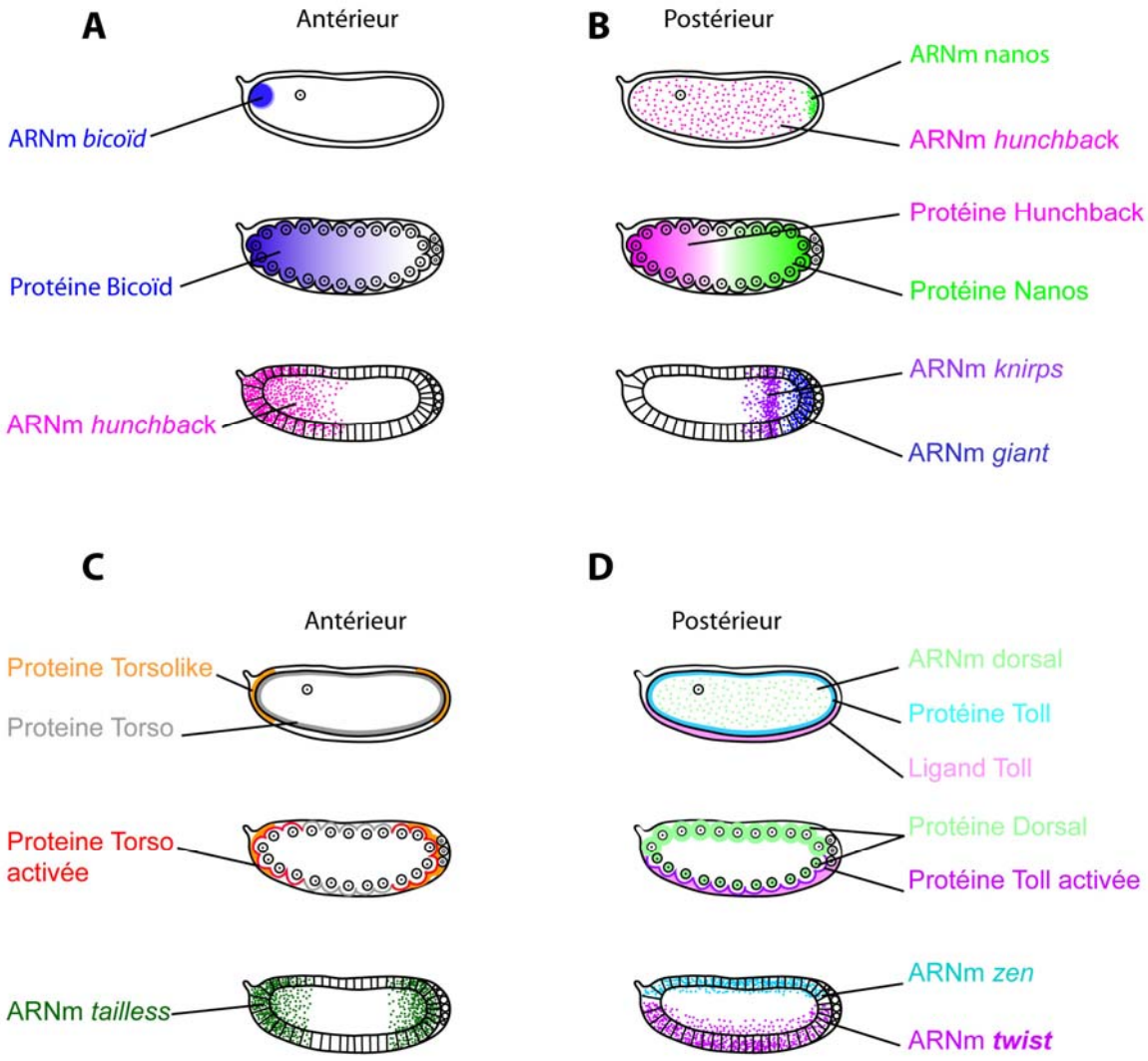
<u>Figure 1</u> : Cycle de vie de la drosophile.
A) Le cycle de vie de *Drosophila melanogaster*. Après fécondation, le développement embryonnaire va conduire, après 22h, à l'éclosion d'une larve, dite de stade 1 (L1). Elle va ensuite croitre au travers de deux mues successives toutes les 72h, pour donner les larves L2 puis L3. La larve va s'immobiliser et former la pupe, dans laquelle se déroule la métamorphose. Après 6 jours, l'adulte ou imago sort de la pupe. Les indications de temps correspondent au cycle de vie de *Drosophila melanogaster* à 25°C. B) Cuticule de larve L1. La larve présente un phénotype cuticulaire stéréotypé et répété dans la région ventrale. Les segments abdominaux présentent une alternance de régions lisses et d'autres possédants des denticules.

Depuis les travaux pionniers initiés au début du XX^{ième} siècle, la drosophile reste un modèle productif pour comprendre les mécanismes génétiques et du développement. Après Morgan en 1933 et Muller en 1946, Ed Lewis, C. Nüsslein-Volhard et E. Wieschaus furent récompensés du Prix Nobel de Médecine en 1995 pour leurs travaux sur le contrôle génétique du développement de la drosophile (Lewis, 1978; Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980).

La drosophile est un insecte à métamorphose complète, ou holométabole (figure 1A). Le développement embryonnaire conduit à la formation d'une larve, capable de se déplacer et se nourrir de façon autonome. La larve va grandir à travers deux mues successives et finalement former une pupe, dans laquelle se déroule la métamorphose pour la formation des organes adultes. La larve présente une morphologie externe segmentée, caractérisée par un patron stéréotypé d'extensions, appelées trichomes, ou denticules dans la région ventrale (figure 1B). Le patron des trichomes représente une carte du plan d'organisation de la larve et de chacun de ses segments. Des cribles génétiques à grande échelle, recherchant des mutations perturbant le patron des trichomes, ont ainsi identifié de nombreux gènes régulateurs de la mise en place du plan d'organisation de la drosophile. L'analyse génétique de leur fonction a établi le concept de l'organisation des gènes contrôlant le développement en véritables réseaux de régulation génique. L'importance générale de ces notions a été étendue à l'ensemble des espèces animales, démontrant une remarquable conservation évolutive des gènes régulant le développement.

Si les travaux de ces généticiens ont collectivement permis une compréhension détaillée des mécanismes impliqués dans la mise en place du patron des trichomes, leur formation à la surface de la larve reste un processus encore mal compris. Depuis une dizaine d'année, le laboratoire dans lequel j'ai réalisé ma thèse s'intéresse aux mécanismes génétiques et cellulaires responsables de la formation des trichomes. Ces extensions sont le résultat d'un changement de forme localisée des cellules épidermiques au cours du développement embryonnaire. La formation des trichomes constitue ainsi un modèle simple pour aborder les mécanismes moléculaires de la morphogenèse, au sein d'un processus de développement dont les mécanismes de régulation sont bien connus.

L'introduction de ce manuscrit abordera successivement les grandes étapes de l'établissement du patron des trichomes, puis celles de la différenciation générale de l'épiderme, et enfin comment ces deux processus contribuent ensemble au contrôle de la forme des cellules épidermiques. Nous développerons ensuite les résultats de nos études et montrerons comment ils contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes de la morphogenèse cellulaire et de la nature de leur lien avec les réseaux de régulation génique.



<u>Figure 2</u> : Etablissement des axes de polarité de l'embryon de Drosophile.
La tête est à gauche, le ventre en bas. Trois stades embryonnaires sont indiqués : l'œuf fécondé, le blastoderme syncytial et le blastoderme cellulaire. A) Le déterminant antérieur codé par *bicoid* est localisé en antérieur. La protéine Bicoid est synthétisée après fécondation et diffuse vers le postérieur en activant la transcription de *hunchback*. B) Le déterminant postérieur est codé par l'ARNm de nanos qui se localise à l'extrémité postérieure. La protéine Nanos diffuse vers l'antérieur et réprime la traduction des ARNm du jeune embryon. Cette expression est indispensable à l'expression des gènes *knirps* et *giant*. C) Le système terminal est composé de molécules extracellulaire d'origine maternelle, mises en réserve dans la membrane vitelline. Ces molécules se fixent à leur récepteur codé par le gène maternel *torso*. L'activation de la protéine Torso stimule l'expression du gène zygotique *tailless*. D) Le système dorso-ventral utilise lui aussi un système ligand/récepteur. Le récepteur Toll réparti uniformément sur la surface de l'embryon est activé uniquement dans la région ventrale grâce la fixation de son ligand, lui-même distribué en gradient depuis la région ventrale. L'activation de Toll permet à la protéine Dorsal de migrer dans le noyau des cellules ventrales pour activer *twist* et réprimer *zen*.

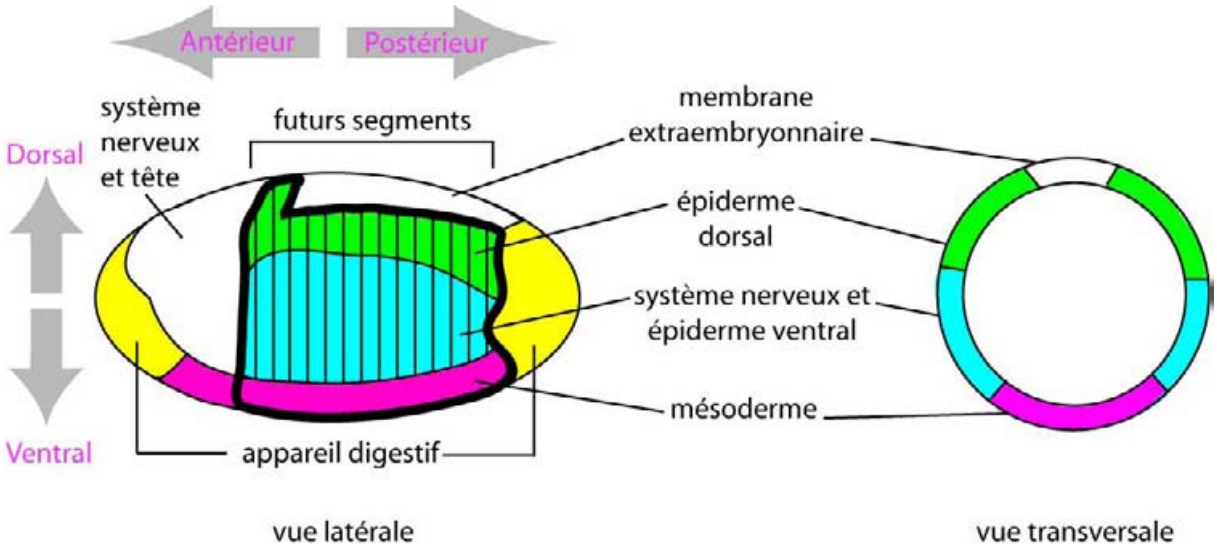
1. Régulation de la mise en place du patron des trichomes

La formation des trichomes de la larve de drosophile est le produit de la différenciation morphologique des cellules de l'épiderme embryonnaire. L'épiderme est un épithélium composé d'une monocouche cellulaire, constituant un modèle simple pour la compréhension générale des processus de morphogenèse. La morphogenèse de l'épiderme requiert schématiquement deux étapes : i) la formation du tissu à partir des territoires présomptifs embryonnaires, ii) la réorganisation de la forme apicale de groupes de cellules épidermiques pour la formation des trichomes. C'est cette deuxième étape de morphogenèse cellulaire qui est au centre de nos intérêts. Elle détermine la mise place des deux sous populations épidermiques : les cellules lisses et celles formant des trichomes. De plus, la différenciation générale des cellules épidermiques va permettre la synthèse de l'enveloppe protectrice du corps de l'animal, la cuticule. Bien que ces deux aspects du contrôle de la formation des trichomes se chevauchent temporellement au cours du développement, ils seront traités dans deux sections distinctes. Dans cette première partie nous allons donc rappeler les principes généraux de la détermination progressive des populations de cellules qui vont finalement former, dans chacun des segments, les denticules ventrales ou trichomes dorsaux.

1.1 Etablissement des grands axes de l'embryon

Après fécondation, les phases précoces du développement de l'embryon de drosophile débutent par une série de divisions rapides et synchrones des noyaux, sans division cellulaire, générant ainsi un syncytium. A partir de la dixième division nucléaire, la plupart des noyaux migrent à la périphérie de l'embryon, formant le blastoderme syncytial, et les précurseurs de la lignée germinale seront les premières cellules à s'individualiser au pole postérieur. Après quatre divisions supplémentaires, la membrane plasmique s'invagine entre les noyaux pour former un épithélium cellulaire. L'embryon au stade blastoderme cellulaire est composé d'environ 6000 cellules somatiques, formant une monocouche de cellules épithéliales polarisées, entourant la masse vitelline (Sugiyama and Jackle, 1993).

Les axes principaux de l'organisme se mettent en place au cours des phases précoces de l'embryogenèse, sous l'action concertée de trois réseaux de régulation géniques pour l'axe antéro-postérieur (antérieur, postérieur et régions terminales) et d'un réseau déterminant la formation de l'axe dorso-ventral.



<u>Figure 3</u> : Territoires embryonnaires présomptifs.
Vue latérale (gauche) et transversale (droite) d'un embryon au stade 5. Dès le stade 5, les différents tissus qui vont composer l'embryon sont déjà définis. En jaune, les futurs tissus de l'appareil digestif. En rose, le mesoderme, en bleu le neuroectoderme, en vert l'épiderme dorsal et en blanc le tissu extra-embryonnaire.

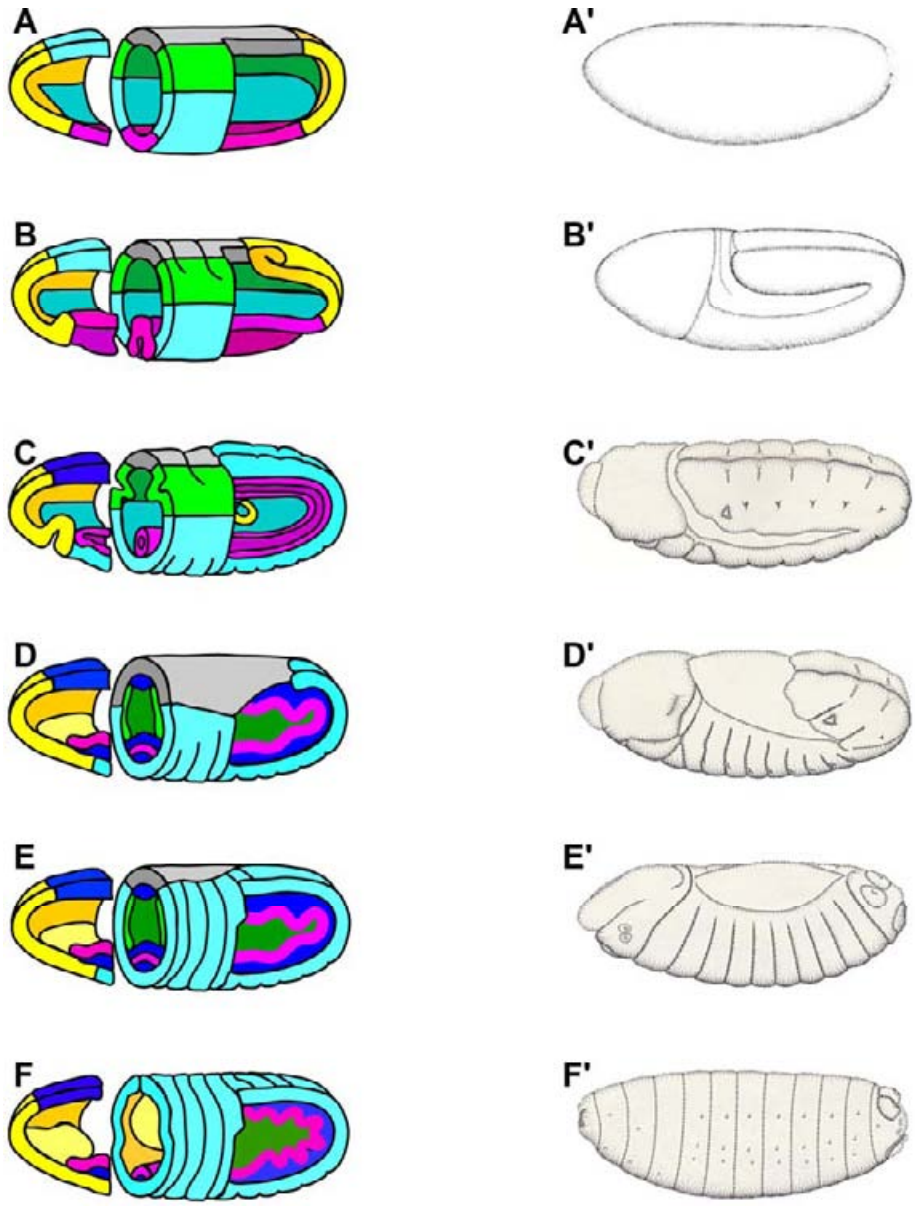
a) Définition de l'axe Antéro-postérieur (A/P)

Le réseau de régulation du système antérieur contrôle la mise en place et le développement de la tête et du thorax (Leptin, 1995). Bicoid est l'élément clé de cette régulation. Son ARNm est synthétisé au cours de l'ovogenèse et reste ancré spécifiquement à la pointe antérieure du jeune embryon. Sa traduction permet à la protéine Bicoid de diffuser vers la région postérieure, établissant ainsi un gradient de concentration A/P (Macdonald and Kerr, 1998). Ce gradient est intégré par les promoteurs de différents gènes cibles, dont l'expression sera restreinte à des grandes régions selon l'axe A/P (figure 2A). La protéine Nanos, d'origine maternelle, est confinée à la partie postérieure de l'embryon et inhibe la traduction de l'ARNm maternel de *hunchback* uniformément réparti. Ainsi la partie postérieure de l'embryon sera dépourvue de la protéine Hunchback. Le gradient de Hunchback résultant détermine alors les domaines d'expression de plusieurs autres gènes impliqués dans la définition de l'axe A/P, tels que *krüppel*, *knirps* et *giant* (figure 2B) (Jackle and Sauer, 1993; Leptin, 1995).

Le système terminal gouverne quant à lui le développement des extrémités non segmentées de l'embryon. Le récepteur Torso est uniformément distribué mais activé exclusivement aux deux pôles de l'embryon, où il induit l'expression de gènes zygotiques tel que *tailless* (figure 2C) (Baek and Lee, 1999).

b) Définition de l'axe dorso-ventral

L'axe dorso-ventral est défini par la formation du gradient d'un facteur de transcription, le produit du gène *dorsal*. Initialement, la protéine Dorsal est distribuée uniformément dans le cytoplasme des cellules embryonnaires. L'étape critique de la distribution de ce facteur est sa translocation dans le noyau. En réponse à un signal déposé au cours de l'ovogenèse, et ce seulement dans la région ventrale, la protéine Dorsal est libérée de l'interaction physique qui la maintenait dans le cytoplasme (Hashimoto et al., 1988). Elle peut alors migrer dans les noyaux, formant ainsi un gradient de concentration « nucléaire » selon l'axe ventro-dorsal (figure 2D) (Leptin, 1995). Ce gradient va activer différentiellement les gènes régulateurs qui spécifient les limites des trois feuillets embryonnaires. A haute concentration, Dorsal active l'expression des gènes *twist* (*twi*) et *snail* (*sna*), alors que les faibles concentrations suffisent à réprimer les gènes *zerknüllt* (*zen*) et *decapentaplegic* (*dpp*) (Morisato and Anderson, 1995). *zen*, *sna* et *twi* codent des facteurs de transcription, tandis que *dpp* code un signal cellulaire



<u>Figure 4</u> : Représentation schématique des mouvements morphogénétiques et de la formation de l'épiderme.

Vues latérales et ouvertes montrant les destins des différents tissus présomptifs au cours de la gastrulation. Au début de la gastrulation, le mésoderme ventral (en rose) s'invagine dans l'embryon pour former un tube. Puis, il y a extension de la bandelette germinale (en bleu). Les cellules mésodermales vont ensuite s'aplatir et s'étendre pour former une couche cellulaire simple. L'endoderme interne (en vert) va à son tour s'invaginer pour recouvrir la surface interne de l'embryon. Le neuroectoderme est en grande partie différencié en système nerveux (vert) et l'épiderme (turquoise). La bandelette germinale se rétracte pour positionner les derniers segments de l'embryon en postérieur. A ce stade les cellules neurales (en bleu foncé) délaminent vers l'intérieur de l'embryon, désormais recouvert par l'épiderme (en turquoise). Les cellules de l'amnioserreusse (en gris) se contractent avant de disparaître de la surface pour être ensuite éliminées par apotose. Les deux moitiés de l'épiderme se rejoignent alors dans le processus de fermeture dorsale.

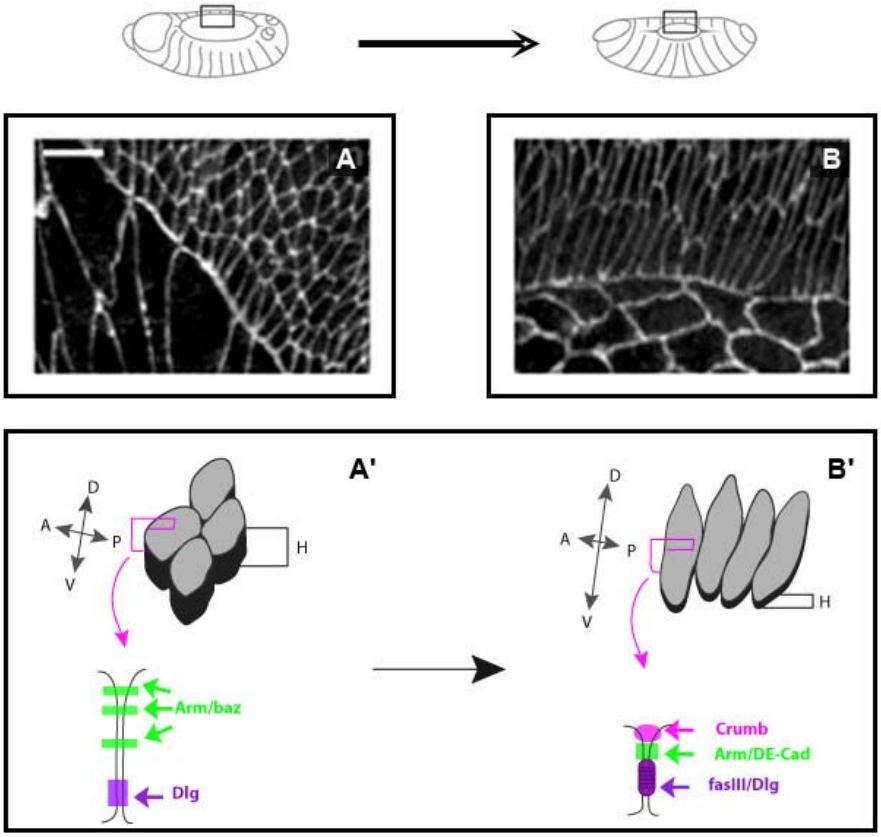
paracrine (TGFbeta). Les interactions mutuelles entre ces gènes (figure2) précisent leurs domaines d'expression et guident la définition des futurs tissus embryonnaires (Leptin, 1995).

1.2 Formation et morphogenèse générale du tissu épidermique.

La mise en place de ces deux axes principaux va permettre ensuite la détermination de territoires présomptifs, à l'origine des futurs tissus de l'embryon (figure 3). Dans la région médiane de l'axe A/P, les cellules les plus ventrales formeront le mésoderme (en rose figure 3). Les cellules les plus dorsales formeront l'amnioséreuse, qui va recouvrir transitoirement l'embryon (en blanc figure 3). Les cellules latérales formeront, selon l'axe D/V, d'abord les futures cellules gliales et neurales et, plus dorsalement, l'épiderme ventral et dorsal (en vert et bleu figure 3).

A la suite de l'invagination du mésoderme, le neuroectoderme, région précurseur de l'épiderme et du système nerveux, va entreprendre une suite de mouvements morphogénétiques, liés à la réorganisation des contacts intercellulaires, de convergence et d'extension (figure 4) (pour revue (Lecuit and Lenne, 2007).

Les mouvements de la gastrulation ne concernent que le blastoderme ventral dont les cellules sont plus hautes et plus volumineuses que celles de la partie dorsale. Sur une carte des territoires embryonnaires, à ce stade, on peut délimiter ventralement une bande médiane, constituant le mésoderme présomptif. Les cellules mésodermiques (en rose figure 4) s'invaginent le long d'un sillon ventral qui se referme pour devenir un tube ventral. Par la suite, le tube mésodermique va s'aplatir et chaque cellule va alors se diviser et migrer le long de l'ectoderme ventral pour former une couche unicellulaire (Jackle and Sauer, 1993; Leptin, 1995). Les cellules ectodermiques engagent un mouvement de convergence pour migrer vers la ligne médiale en ventral et participer à la formation de la bandelette germinale (en bleu figure 4). La bandelette germinale est une structure transitoire composée des cellules ectodermiques en interaction intime avec le mésoderme sous jacent. Au cours de son extension, elle va s'étirer selon l'axe A/P pour doubler sa longueur, tout en diminuant sa largeur. Les futures cellules épidermiques participent à cette extension, notamment par des divisions cellulaires qui s'arrêtent cependant à la fin d'une phase rapide d'élongation. Les cellules neurales ne se divisent pas mais participent aussi à ce mouvement par l'accroissement de leur taille. Après cette phase rapide, l'extension de la bandelette germinale continue grâce,

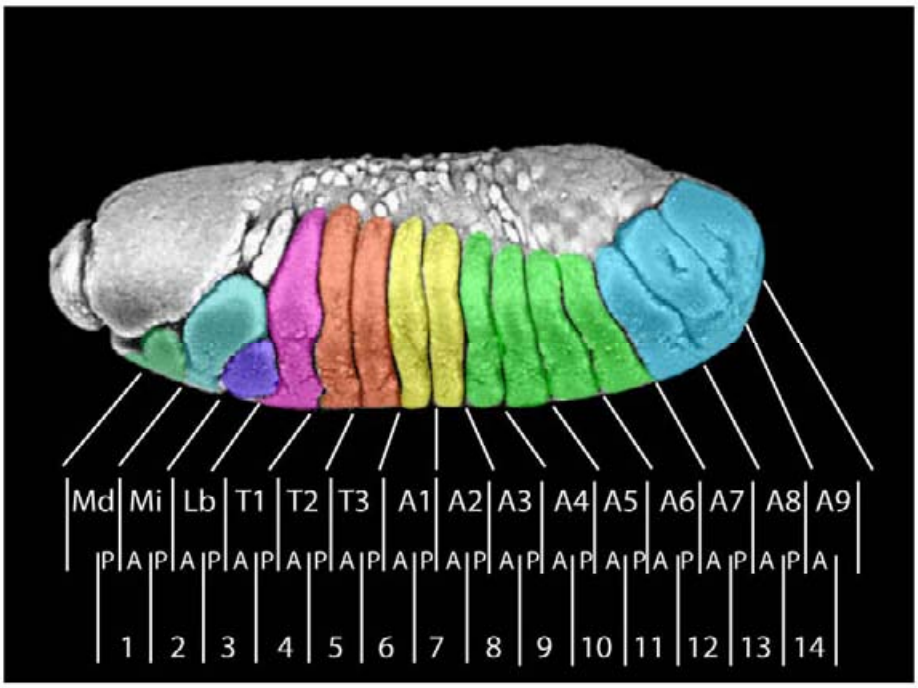


<u>Figure 5 :</u> Morphogenèse des cellules épidermiques au cours de la fermeture dorsale.
A,B) Représentation schématique de la fermeture dorsale. A) Les cellules épidermiques sont rondes et non alignées. Les cellules de la marge sont en contact avec l'amnioséreuse. A ce stade, l'actine (en blanc) s'accumule à la frontière des deux tissus et marque les contours cellulaires. B) En fin de fermeture dorsale, les cellules épidermiques s'allongent selon l'axe dorso-ventral et s'alignent. A', B') Schéma du changement de la forme des cellules épidermiques au cours de la fermeture dorsale correspondant aux images A et B respectivement. Schéma de localisation des différents complexes jonctionnels déterminant l'identité apico-latéro-basale au cours de la fermeture dorsale. (D'après Köppen M et al., 2006).

cette fois, à des processus d'intercalation cellulaire (Irvine and Wieschaus, 1994). La bandelette germinale va ensuite se rétracter, aboutissant au positionnement de la partie caudale dans la région postérieure de l'embryon. L'amniosereuse va alors recouvrir dorsalement le sac vitellin (en gris, figure 4). Ce tissu transitoire pourrait contribuer au mouvement de la bandelette germinale en repoussant les cellules les plus postérieures de la bandelette et les derniers segments postérieurs de l'embryon (Schock and Perrimon, 2003). A ce stade, les cellules neurales ont délaminé vers l'intérieur de l'embryon, dont la couche cellulaire externe constitue maintenant l'épiderme (en vert, figure 4). Le tissu épidermique commence alors un mouvement coordonné pour recouvrir entièrement l'amnioséreuse et fusionner dans la région la plus dorsale, un processus appelé la fermeture dorsale (en bleu, figure 4). La fermeture dorsale résulte d'une réorganisation de la forme tridimensionnelle des cellules épidermiques dorsales, encore positionnées de manière bilatérale dans l'embryon. Ces cellules vont s'aplatir et s'allonger, sans intervention de division ou d'intercalation cellulaire et migrer dorsalement (figure 5). La rangée cellulaire la plus dorsale joue un rôle majeur dans la fermeture, en organisant un large câble composé d'actine et de myosine II non musculaire (Walters et al., 2006). La contraction de ce câble d'acto-myosine va permettre de rapprocher les cellules épidermiques à la face dorsale de l'embryon (figure 5). Les cellules de l'amnioséreuse se contractent pour progressivement disparaître de la surface apicale et ensuite être éliminées par apoptose (Kiehart et al., 2000). Les deux moitiés latérales de l'épiderme se retrouvent ainsi sur la ligne médiane de la région dorsale. La suture dorsale de l'épiderme est initiée par la formation de filopodes (Millard and Martin, 2008), aboutissant finalement à relier ensemble les parties gauche et droite de l'épiderme (figure 5).

1.3 Définition des compartiments cellulaires au sein du tissu : la segmentation.

De manière concomitante à la formation du tissu épidermique, les cellules s'engagent progressivement dans la spécification de destins différents en fonction de leurs coordonnées à la fois D/V et A/P. L'action concertée de Bicoid et des gènes régulateurs va déclencher la transcription d'une nouvelle série de facteurs de régulation transcriptionnelle, les déterminants parasegmentaires. L'expression localisée de ces déterminants divise l'embryon (blastoderme cellulaire) en une série de 14 groupes cellulaires, répétés le long de l'axe A/P, appelés les parasegments (PS). Ces PS ne correspondent pas exactement aux limites morphologiques des segments de la larve ou de l'adulte. Chaque PS est composé en réalité de la partie postérieure d'un segment (S) et la partie antérieure du segment suivant (figure 6) (Deutsch, 2004). Les



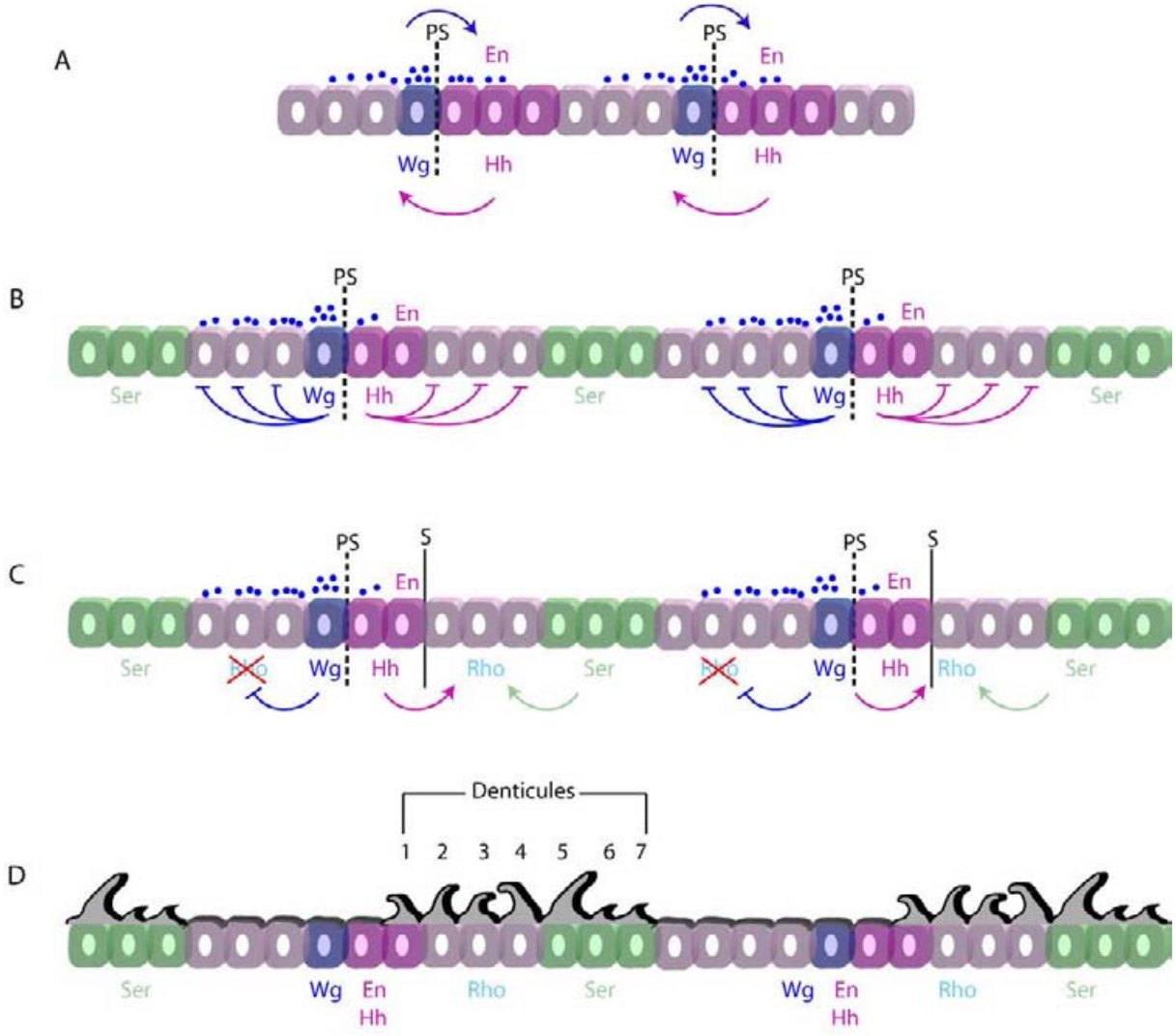
<u>Figure 6 :</u> Segmentation de l'embryon.
Image en microscopie électronique à balayage d'un embryon au stade 14. Le dégradé de couleurs représente l'expression des différents gènes *hox* essentiels pour la segmentation de l'embryon. On distingue 3 segments céphaliques (Md, Mx et Lb), 3 segments thoraciques (T1à T3) et 9 segments abdominaux (A1 à A9). Les régions terminales de l'animal, *l'acron* en avant du premier métamère et le *telson* en arrière du dernier ne sont pas des métamères. L'embryon est aussi divisé en 14 parasegments (PS) qui ne correspondent pas aux segments (S) de la larve ou de l'adulte. Un PS comprend le compartiment postérieur (P) d'un S et le compartiment antérieur (A) du S suivant.

gènes de segmentation commandent la formation des S lorsque les axes principaux de l'embryon sont définis et sont répartis en 3 classes, qui s'expriment séquentiellement. Les gènes « gap » ou de délétion, subdivisent l'embryon selon l'axe A/P en larges régions comportant plusieurs ébauches de PS. Les gènes de parité segmentaire divisent ces grandes régions en PS et les gènes de polarité segmentaire établissent la limite entre les compartiments antérieurs et postérieurs, au sein de chacun des segments. Enfin, la combinatoire d'expression des gènes de segmentation selon l'axe A/P, permet de contrôler l'expression des gènes sélecteurs homéotiques (Hox), déterminant l'identité spécifique de chaque segment (figure 6).

La définition du sous-ensemble des cellules épidermiques qui forment des trichomes est intimement liée aux mécanismes de la segmentation, notamment à l'établissement progressif de sous-populations différentes au sein de chaque segment.

a) Les acteurs de la polarité segmentaire.

Les facteurs clés de la polarisation segmentaire sont des facteurs diffusibles qui régulent des voies de signalisation cellulaire : Wingless (Wg) et Hedgehog (Hh). Wg est un des membres fondateurs de la famille Wnt. Hh est un morphogène secrété par les cellules exprimant le facteur de transcription Engrailed (En) et dont le nom rappelle qu'en son absence l'embryon est entièrement hérissé de trichomes. Les domaines d'expression de Wg et de Hh sont contigus et forment un centre organisateur bipartite qui va délimiter la frontière entre chaque PS (Mann and Morata, 2000). Chaque PS est visible au stade 10–11, par la formation d'un sillon passager à l'interface entre les cellules exprimant Wg et En/Hh. Plus tard, à partir du stade 12, chaque segment est souligné par un sillon morphologique persistant, qui se forme au bord postérieur de la frontière d'En/Hh. L'interaction entre ces deux voies de signalisation définit l'organisation des différentes unités cellulaires, ainsi que l'établissement de véritables barrières entre les unités adjacentes (Deutsch, 2004). Au sein d'un segment, chaque cellule va suivre un destin propre déterminant sa différenciation morphologique, c'est-à-dire pour les cellules épidermiques l'adoption d'une surface apicale lisse ou la formation d'un trichome.



<u>Figure 7 :</u> La signalisation intrasegmentaire dans l'épiderme embryonnaire ventral.
A) Au stade 9-10, les expressions de Wg et En/Hh sont interdépendantes et le gradient de Wg est symétrique. B) Au stade 11, l'expression Wg devient indépendante de celle de En/Hh et le gradient de Wg devient asymétrique. En même temps, le domaine Ser est délimité par les actions répressives à la fois de Wg et de Hh. C) Au stade 12, Hh active l'expression Rho dans deux rangées cellulaires postérieures au domaine En/Hh et Ser active Rho dans la rangée antérieure à son domaine. À la fin du stade 12, les frontières PS ne sont plus visibles et les sillons de segment sont formés immédiatement en postérieur des cellules En. D) En fin d'embryogénèse, la rangée la plus postérieure des cellules En, les cellules Rho et Ser, vont former les denticules. La signalisation Wg spécifie la cuticule lisse, sur trois à quatre diamètres cellulaires vers l'antérieur, et seulement la première rangée de cellules En vers le postérieur. PS désigne les frontières parasegmentaires et S les frontières segmentaires. L'antérieur de l'embryon est à gauche, la face apicale des cellules est en haut. Des petits points bleus représentent le gradient extracellulaire de la protéine Wg. (D'après de Sanson et al., 2001)

b) Mise en place d'un centre organisateur

Au cours des étapes précoces de l'embryogenèse (stades 9-10), les expressions de Wg et Hh sont interdépendantes (figure 7A). L'activation paracrine de la voie Wg maintient l'expression du facteur de transcription En dans les cellules adjacentes à celles exprimant Wg. Réciproquement, le facteur En active l'expression du morphogène Hh, qui renforce l'expression de Wg dans les cellules voisines. L'expression de En/Hh devient ensuite indépendante de Wg, marquant ainsi le début de la signalisation intra-segmentale (figure 7B). Dès le stade 11, la combinatoire des gènes de polarité et des gènes homéotiques (Hox) délimite l'expression du facteur Serrate (Ser), un ligand de la voie Notch, à une bande unique de cellule dans chaque PS abdominal. Hh, sécrété par les cellules exprimant En, réprime dans les rangées immédiatement postérieures l'expression de Ser (figure 7C). De son coté, Wg réprime aussi l'expression de Ser en diffusant vers les rangées cellulaires antérieures. Ser, via l'activation de la voie de signalisation Notch, stimule l'expression de *rhomboid (rho*) dans les cellules directement adjacentes. *rho* code une protéase transmembranaire, requise pour l'activation du ligand Spitz, qui active à son tour de la voie du récepteur à l'EGF (EGF-r) (figure 7C). De chaque coté des cellules productrices, Hh active l'expression de Rho sur deux diamètres cellulaires, alors que Wg la réprime vers l'antérieur (Sanson, 2001). Cette signalisation antagoniste permet ainsi de délimiter l'expression de Rho dans trois rangées cellulaires en postérieur du domaine En, créant l'asymétrie nécessaire à la polarité de chaque segment (figure 7D).

A la fin du stade 12, les cellules de chaque segment sont ainsi subdivisées en cinq domaines, dont quatre produisent des ligands activateurs de différentes voies de signalisation : Spi (EGF-r), Ser (Notch), Wg (Wnt) ou Hh. C'est l'interaction entre ces voies de signalisation qui va permettre de créer et d'affiner la spécification de chaque sous-population, avec une résolution « à la cellule près ».

c) Spécification des différents destins cellulaires.

Le gradient du morphogène Wg évolue au cours de l'embryogenèse, régulant ainsi l'expression de différents gènes cibles dans les cellules receveuses. Lorsque Wg est nécessaire au maintien de l'expression de En, son gradient est symétrique par rapport la frontière parasegmentaire. Puis, au stade 11, la distribution de Wg devient asymétrique de part et d'autre de la frontière du PS (figure 7B-C) (Sanson et al., 1999). Cette asymétrie est établie grâce d'une part à la signalisation Hh et d'autre part à la dégradation accélérée de Wg dans les

cellules exprimant En (Dubois et al., 2001). Contrairement à Wg, les signaux Spi et Ser agissent à faible distance et sont distribués symétriquement vis-à-vis des cellules sources (Sanson, 2001). Spi est exprimé uniformément dans l'épiderme mais sous une forme inactive. C'est l'action de la protéase Rho, qui permet sa maturation et donc son activité pour déclencher la voie du récepteur à l'EGF (Alexandre et al., 1999). Ser est un ligand transmembranaire de la voie Notch qui n'agit que sur les cellules adjacentes à son domaine d'expression (Hatini and DiNardo, 2001). Enfin, la sécrétion de Hh établit un gradient capable de signaler sur trois rangées cellulaires vers le postérieur depuis les cellules sources.

Au stade 12, les mêmes voies de signalisation vont déterminer le destin morphologique de chaque cellule épidermique. Par la suite, nous ne présentons ici que les mécanismes agissant dans la détermination du destin des cellules épidermiques ventrales, c'est-à-dire le choix entre une surface lisse et la formation des denticules. En absence de Wg, l'ensemble de l'épiderme est recouvert de denticules alors que l'expression ectopique de ce facteur conduit à une cuticule entièrement « nue ». Wg est donc capable de spécifier le destin des cellules lisses. Au contraire, l'activation de la voie EGF-r promeut la formation des denticules. (Hatini and DiNardo, 2001; Payre, 2004; Sanson, 2001). Toutefois, les domaines définis par ces deux voies seront par la suite affinés afin de créer une identité propre pour chacune des cellules qui constitue le S. L'expression constitutive d'une forme dominante négative du récepteur à l'EGF étend le domaine des cellules épidermiques lisses, en réduisant la formation des denticules à 2-3 rangées cellulaires sur les 7 normalement observées dans la région abdominale d'un embryon sauvage. De même, dans les mutants *ser* on constate la réduction du nombre de denticules, montrant la nécessité de l'activation de la voie Notch pour réguler le destin des cellules à denticules. La voie Notch est de plus modulée négativement par la glycosyl-transferase Fringe (Fng). En effet, les mutants *fng* présentent des denticules surnuméraires qui vont se former dans les rangées 2 à 4, sans pourtant être affectées dans leur forme (Walters et al., 2006). Il semble donc qu'un excès de la voie Notch conduit en retour à la sur-activation de la voie EGF-r et par conséquent à la formation de rangées supplémentaires de denticules. Le rôle antagoniste des voies Wnt et EGF-r pour le destin morphologique des cellules épidermiques montre ici l'importance d'une régulation précise permettant d'établir le profil des cellules à trichomes.

2. Les cellules épidermiques et la mise en place de leur polarité.

L'épiderme est un tissu épithélial, composé de cellules sécrétrices hautement polarisées selon l'axe apico-basal et en interaction avec les autres tissus embryonnaires par leur face basale, et avec le milieu extérieur par leur région apicale. Les cellules épidermiques sont étroitement connectées entre elles par des contacts intercellulaires. Ces contacts mettent en jeu des jonctions cellulaires spécialisées, qui assurent la cohésion du tissu et aussi la communication entre cellules. Il existe plusieurs types de jonctions cellulaires réparties selon l'axe apico-basal et différant par leurs compositions moléculaires et leurs propriétés mécaniques. L'établissement des jonctions cellulaires est intimement lié à la polarité générale des cellules épithéliales et en interaction étroite avec la définition des différents domaines membranaires (Tepass et al., 2001). L'analyse génétique des cellules épidermiques embryonnaires a contribué de manière très importante à la compréhension des mécanismes d'établissement de la polarité et des jonctions cellulaires en général.

2.1 Définition de la polarité apico-basale des cellules

La mise en place progressive de la différenciation apico-basale de cellules de l'épiderme embryonnaire peut être divisée en trois phases : la formation des cellules par invagination asymétrique de la membrane plasmique, la formation des Zones d'Adhérence (ZA) intercellulaires et enfin la maturation des jonctions cellulaires. L'établissement correct des jonctions entre les cellules épidermiques est critique pour la fonction du tissu, assurant la cohésion de l'épithélium et empêchant la diffusion des molécules internes ou externes le long des membranes latérales des cellules adjacentes.

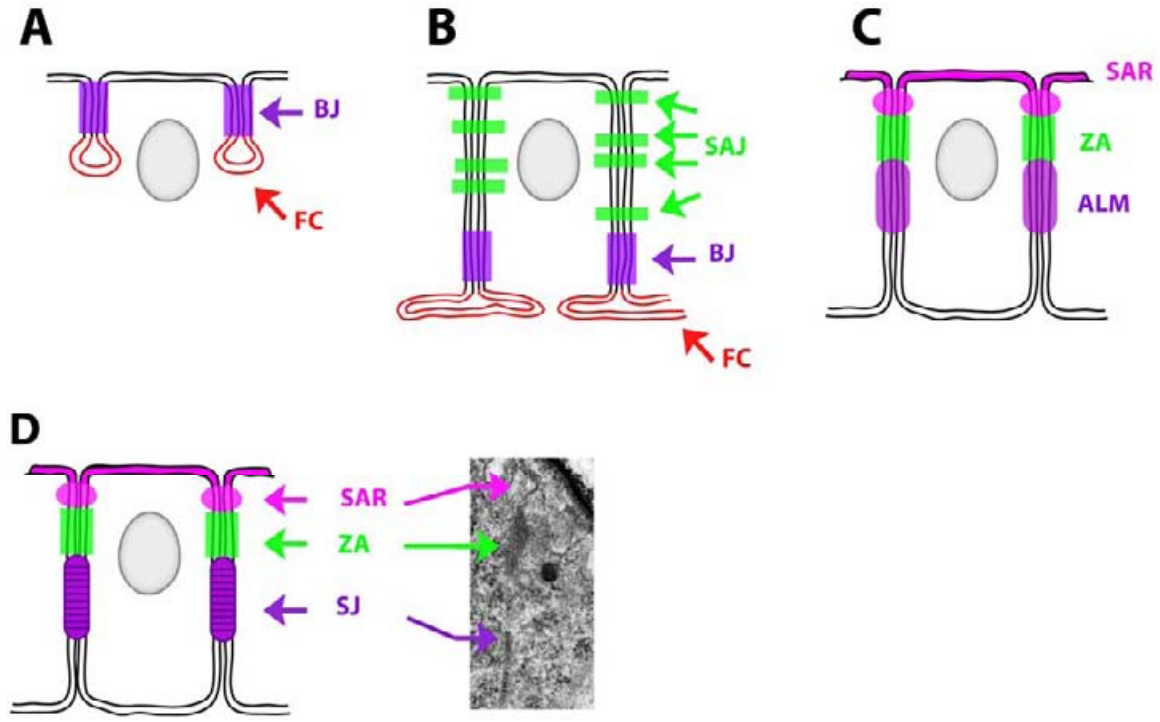
a) Du blastoderme syncytial au blastoderme cellulaire.

Nous avons introduit plus haut que les premières étapes du développement de la drosophile se déroulent dans un large syncytium, favorisant par exemple la formation de gradients morphogénétiques. Le processus, dit de cellularisation, va ensuite permettre d'intégrer chacun des noyaux dans une cellule individuelle, pour former une monocouche cellulaire à la périphérie de l'embryon (blastoderme cellulaire). L'invagination de la membrane plasmique entre chaque noyau présente d'abord une phase lente, suivie d'une phase plus rapide de

formation de membrane (Lecuit and Wieschaus, 2000; Turner and Mahowald, 1976). Au cours de cette invagination, le complexe protéique Cadhérine/Caténine et la β_H-spectrine vont être accumulés. Ce complexe est impliqué dans la formation des jonctions adhérentes (AJ), connues pour établir un contact particulièrement étroit entre les cellules. Ces invaginations membranaires présentent aussi une accumulation d'actine et de myosine corticale, produisant la force nécessaire pour insérer la nouvelle membrane latérale entre les noyaux (Warn and Robert-Nicoud, 1990; Warn et al., 1990). *Nullo, slow as molasses* (*slam*), *bottleneck* (*bnk*) et *serendipity-*α (*sry-*α) sont des gènes zygotiques identifiés pour leur rôle dans l'organisation du réseau d'actine au cours de la cellularisation (Lecuit et al., 2002; Schweisguth et al., 1990; Wieschaus and Sweeton, 1988). Nullo, dont la fonction est spécifiquement requise en milieu de cellularisation, est nécessaire pour limiter la formation des complexes cadhérine/caténine à la partie apicale des membranes latérales en formation (Hunter and Wieschaus, 2000). Slam a un rôle dans la spécification du canal d'invagination, en suivant la progression de la jonction basale tout au long de la formation de la membrane latérale (Beronja and Tepass, 2002). Bnk et Sry-α sont localisées à l'apical, le long des membranes latérales du sillon, et s'accumule au niveau des canaux d'invagination. De plus la colocalisation de ces deux protéines avec la F-actine suggèrent fortement qu'elles pourraient être nécessaires pour le positionnement initial et/ou la stabilité du réseau de F-actine. (Schejter and Wieschaus, 1993; Schweisguth et al., 1990). Le rôle de la F-actine et des protéines associées est essentiel au cours de l'extension de la membrane cellulaire ainsi qu'à la distribution des noyaux afin d'établir une monocouche cellulaire. Ces deux protéines contribuent donc à la fois au placement des noyaux et à l'élongation des membranes au cours de la cellularisation. Les membranes s'allongent donc basalement et d'autres points de ZA sont formés tout au long de cette future membrane latérale (Muller and Wieschaus, 1996). Une fois que les sillons membranaires ont passé la base des noyaux, les canaux d'invagination s'étendent latéralement pour produire la membrane basale et fusionnent entre eux pour former une unité cellulaire (figure 8). Pendant cette phase, les ZA sont aussi réorganisées pour se concentrer uniquement au pôle apical des cellules (Lecuit and Wieschaus, 2000).

b) Formation de la *zonula adherens* : mise en place de la polarité A/P.

A la fin de la cellularisation débute la maturation de la ZA, accompagnée de la restriction de la formation des jonctions adhérentes (AJ) dans la région apicale des cellules. Ce processus

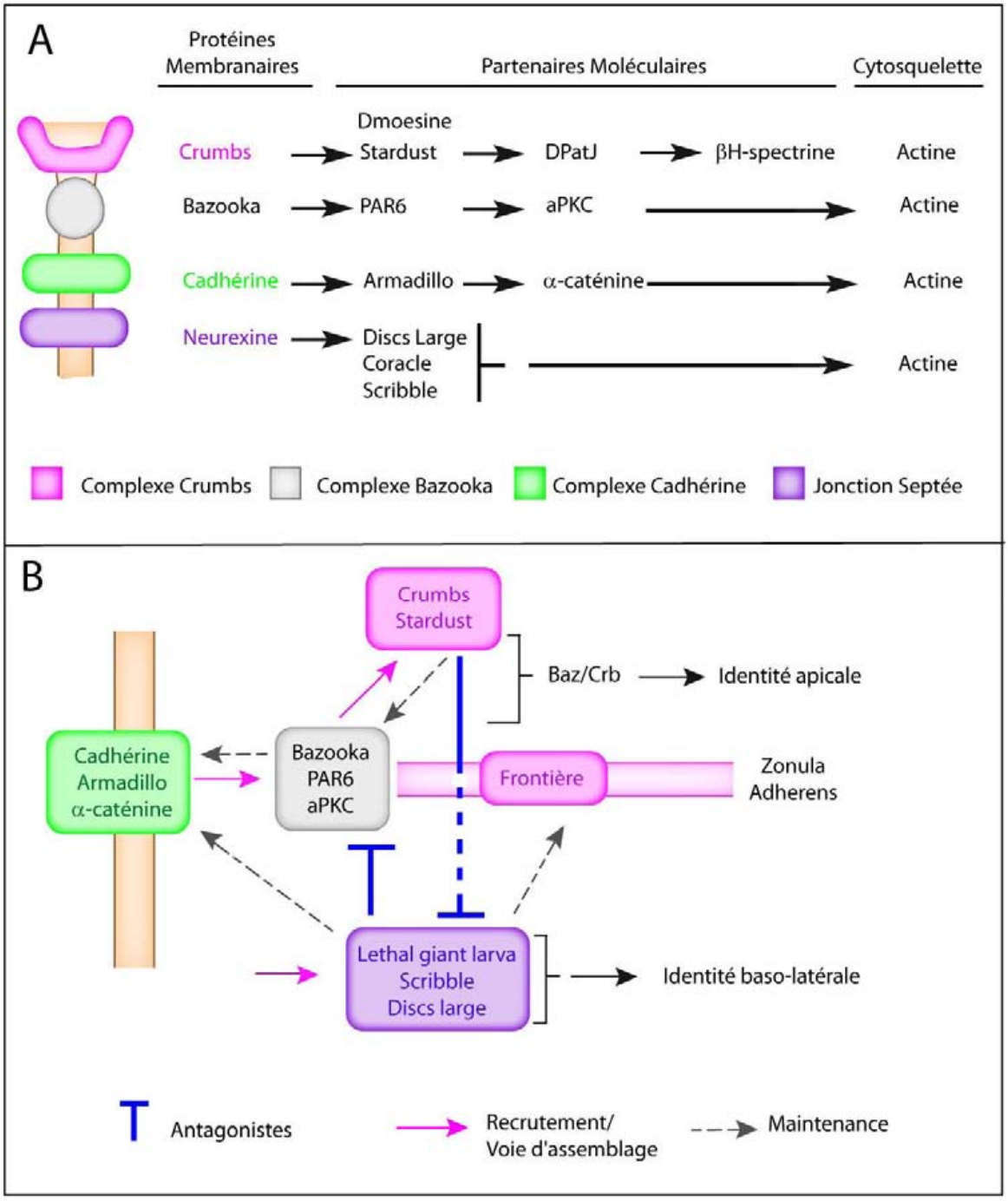


<u>Figure 8 :</u> Formation des jonctions au cours de la cellularisation.
Chez les invertébrés, les jonctions des cellules épithéliales sont composées en apical par la Zonula Adherens (ZA) et en latéral les Jonctions Septées (SJ). Les différentes étapes de la formation des cellules épithéliales au cours de l'embryogénèse de la Drosophile. A) Au cours de la première étape de la formation des cellules (cellularisation), un sillon de clivage (Furrow Canal ou FC) et les jonctions adhérentes basales (Basal Junction ou BJ) sont formés. B) Formation de la ZA : Le sillon de clivage se déplace basalement et une fois en dessous du noyau, il s'élargit latéralement pour fusionner les sillons adjacents. En milieu de cellularisation, les jonctions adhérentes (SubApical Junction ou SAJ) se forment tout au long de la membrane latérale avec une accumulation préférentielle au pôle apical. En début de gastrulation, les SAJ fusionnent à l'apex pour former la ZA. C) Maturation de la ZA : Au cours de la gastrulation, une région subapicale (SubApical Region ouSAR) et une marge apicale du domaine latéral (Apical Lateral Margin ou ALM) sont formées. Le SAR et l'ALM fournissent des informations spatiales nécessaires pour placer correctement la ZA et en contrôler la formation. D) Maturation des jonctions épithéliales : au stade tardif de l'embryogénèse (après la rétraction de bandelette germinale), les jonctions septées (Septate Junction ou SJ) sont formées et le complexe jonctionnel épithélial est entièrement différencié.

nécessite la fonction des gènes *bazooka* (*baz*), *atypical* PKC (*Da*PKC), et *armadillo* (*arm*) (Muller and Wieschaus, 1996). Le produit du gène *stardust* (*sdt*) semble aussi agir avec Baz pour localiser les jonctions adhérentes en cours de maturation au pole apical (Tanentzapf and Tepass, 2003). Cependant, il n'existe pas de marqueur précoce de la membrane apicale, rendant difficile la compréhension précise de ce mécanisme. En effet, Crumbs (Crb) est la première protéine dont la localisation est restreinte au domaine apical mais elle intervient dans des étapes ultérieures du développement.

Il existe de nombreux gènes dont la mutation affecte la maturation de la ZA, comme *scribble* (*scrib*), *sdt* ou *crb.* En absence de ces produits, la cellularisation et la formation de la ZA ne sont pas affectées mais les AJs se fragmentent et ne parviennent pas à former une ceinture apico-latérale continue (Tepass et al., 1996). Le composant principal des jonctions adhérentes est la E-Cadherine, une large protéine transmembranaire qui établit des interactions homotypiques fortes, capables de relier entre elles deux cellules voisines. La région intra-cytoplasmique de la E-Cadherine interagit avec la Catenine, produisant un lien étroit entre les jonctions cellulaires et le cytosquelette d'actine. Le domaine membranaire apical est défini par l'accumulation de deux complexes protéiques : le complexe Crb et le complexe Baz (figure 9). Le complexe Crb est composé de la protéine cytoplasmique Drosiphila Pals-associated tight junction proteint (DPatJ) qui se lie à la protéine MAGUK Stardust (Sdt), elle-même liée via le motif ERLI au domaine carboxy-terminal de Crb (Bachmann et al., 2001; Pielage et al., 2003). Le complexe Baz est composé des protéines DmPAR-6 et DaPKC, toutes deux liées à la protéine Baz (figure 9). Ces complexes établissent de larges échafaudages moléculaires en association avec la membrane apicale, nécessaires pour activer de manière localisée certains signaux cellulaires et pour polariser le traffic vésiculaire (Assemat et al., 2008). Crb interagit aussi avec des protéines associées à l'actine : la Dmoesin et la β_H-Spectrin (Medina et al., 2002). Le domaine N-terminal de la Dmoesin (domaine FERM) est en effet capable de lier la partie intra-cytoplasmique de Crb, créant un lien moléculaire entre ces complexes de polarité et le cytosquelette d'actine (Medina et al., 2002).

Au dessous de la ZA, se trouve une région appelée la marge apicale de la membrane latérale ou ALM (Muller and Bossinger, 2003) (figure 8), dont la définition dépend aussi de l'accumulation localisée de complexes protéiques impliquant Disc Large (Dlg), Lethal Giant Larval (Lgl) (Bilder et al., 2000) et Scribble (Scrib) (Bilder and Perrimon, 2000). Dans les cellules épidermiques, Dlg et Scrib co-localisent au niveau de l'ALM alors que la distribution



<u>Figure 9 :</u> Formation des complexes de jonctions apicales.
A) Les cellules épithéliales polarisées forment une monocouche dans laquelle l'apical est séparé à la frontière avec les membranes basales et latérales par le complexe apical de jonction. Le schéma montre l'organisation moléculaire du complexe apical de jonction. Chez la Drosophile, ce complexe est composé de l'apex vers le basal par : une région sub-apicale (SAR) dont Crumbs (Crb) est l'acteur principal, la jonction adhérente (AJ ou ZA) constituée par les complexes Bazooka (Baz) et Cadhérine (Cad) et enfin les jonctions septées composées par le complexe Lethal giant larvae (Lgl) et Discs large (Dlg). B) Schéma simplifié des interactions entre les différents complexes de la jonction apicale permettant l'adhérence cellulaire. Le complexe Cadhérine recrute à la membrane apicale les complexes Baz/Crb et à la membrane latérale le complexe Lgl/Dlg. Le recrutement de Crb à la région sub-apicale

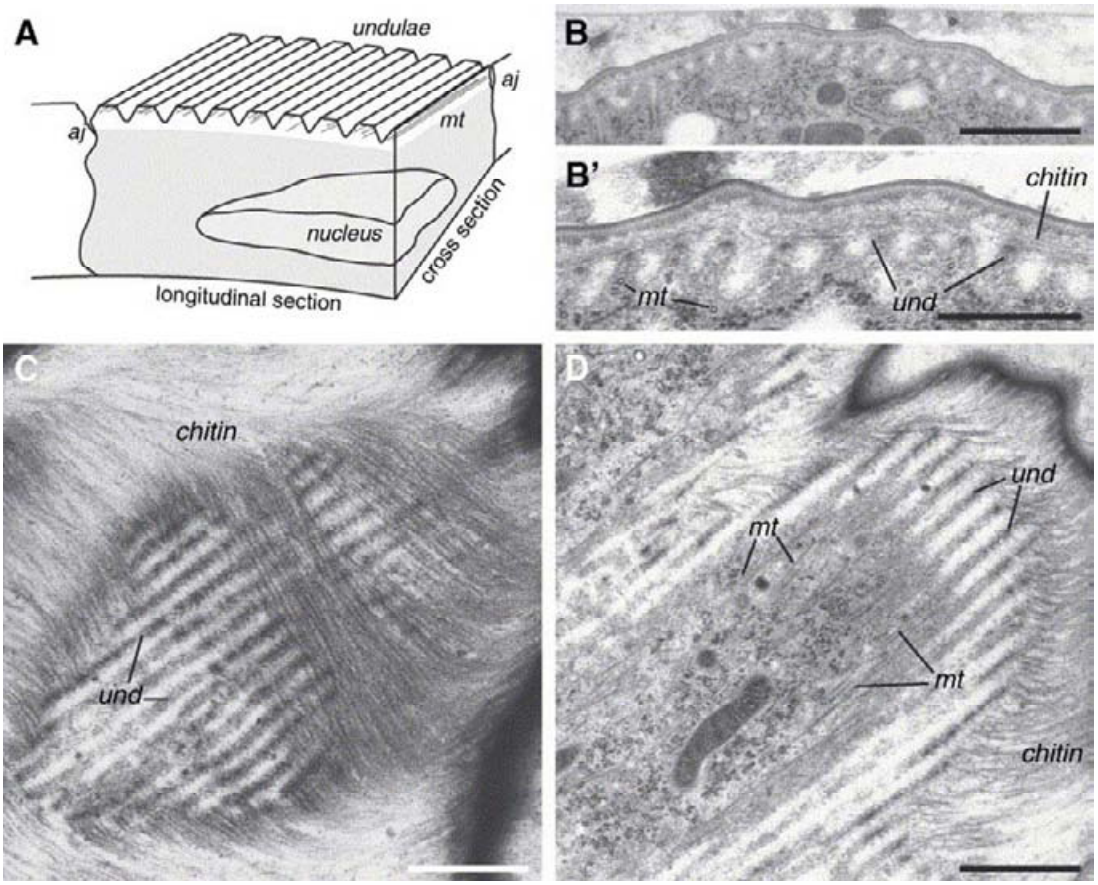
subcellulaire de Lgl est plus large (Bilder et al., 2000). Toutefois, Lgl semble nécessaire pour restreindre la localisation membranaire de Dlg et Scrib à l'ALM car on observe une extension de leur distribution dans les mutants *lgl* (Bilder et al., 2000).

Ces différents complexes protéiques interagissent fonctionnellement pour définir et/ou maintenir les limites entre les domaines membranaires selon l'axe apico-basal des cellules. Par exemple, la diminution de l'activité de *scrib*, *dlg* ou *lgl* compense au moins partiellement l'absence de *crb* pour la polarisation des cellules épidermiques. Dans des cellules normales, Scrib contrecarre l'identité apicale de la membrane en bloquant l'activité du complexe Baz le long de la membrane latérale. Le complexe Crb est recruté par le complexe Baz dans la région apicale de la cellule et va pouvoir alors inhiber sa latéralisation (Bilder, 2003). Ainsi, la membrane de la cellule épithéliale est divisée en trois sous domaines interdépendants: le domaine apical défini par la distribution des complexes Baz/Crb, latéral avec le complexe E-Cad/Cat et baso-latéral avec Dlg/Scrib (figure 9). Enfin, plus récemment, la protéine FERM (4.1 proteins ezrin, radixin, moesin) Yurt (Yrt) a été identifiée comme étant un régulateur négatif du complexe Crb (Laprise et al., 2006). Cette protéine ce localise le long de la membrane baso-latérale et n'est recruté au complexe Crb qu'en fin de différenciation épithéliale, la plaçant ainsi comme protéine organisatrice du domaine baso-latéral (Laprise et al., 2006).

c) <u>Maturation des complexes jonctionnels : établissement d'une barrière étanche.</u>

La formation des jonctions cellulaires fonctionnelles nécessite une étape supplémentaire de « maturation » (figure 9). Elle implique la formation de jonctions dans le domaine latéral, les jonctions septées (SJs) (Bilder et al., 2003; Wodarz et al., 1995). La formation de SJs dépend de l'activité de Dlg, Scrib et de la protéine transmembranaire Neurexin (Nrx) (Baumgartner et al., 1996; Bilder et al., 2003). Etonnamment, dans les mutants *lgl*, les SJs sont correctement formées, alors que la localisation des protéines Dlg et Scrib dépasse largement la région ALM et s'étend tout au long de la membrane latérale (Bilder et al., 2000; Tanentzapf and Tepass, 2003). Ces résultats suggèrent que le complexe Dlg/Scrib possède deux fonctions distinctes : i) Dlg et Scrib contrôlerait d'abord le positionnement latéral de l'ALM ; ii) Dlg et Scrib joueraient ensuite un rôle dans la formation des jonctions septées au cours de la maturation épithéliale. De plus, il a été récemment démontré que Yrt est un interacteur génétique de Nrx bien qu'elle n'interagisse pas génétiquement avec le complexe Dlg/Lgl (Laprise et al., 2009). Toutefois, les mutants *yrt*, contrairement aux mutants *nrx*, ne montre aucun défaut de

limite la formation du complexe Lgl/Dlg au domaine latéral, encadrant ainsi le domaine apical où le complexe Baz/Cad va pouvoir établir les AJ (Inspiré de Nelson et al., 2003).



<u>Figure 10 :</u> Les *undulae* sont formés à la surface apicale des cellules épidermiques.
A) Schéma d'une section d'embryon au stade 17 montrant les *undulae* (*und*) à la surface apicale. La section longitudinale montre que les *undulae* ressemblent à des microvillosités régulières de la membrane apicale, alors que la section transversale montre une surface lisse. B) Section longitudinale d'un embryon au stade 17. B′). Grossissement de la surface apicale de B. On distingue les *undulae* à la surface desquelles la chitine a été déposée. C,D). Section longitudinale-oblique d'un embryon au stade 17. C) On peut voir les microfibrilles de chitine, qui sont orientées perpendiculairement aux *undulae* présentes à la surface apicale des cellules. D) Sous la membrane apicale, on découvre les microtubules (mt) qui soutiennent les *undulae*. aj, jonction adhérente. Echelle B, C et D 1 μm, B′ 500 nm (D'après Moussian et al., 2006).

l'ultrastructure des SJ, bien qu'ils montrent quand même une altération dans leur fonction de barrière (plus d'étanchéité), démontrant que Yrt et Nrx ont des fonctions distinctes (Laprise et al., 2009).

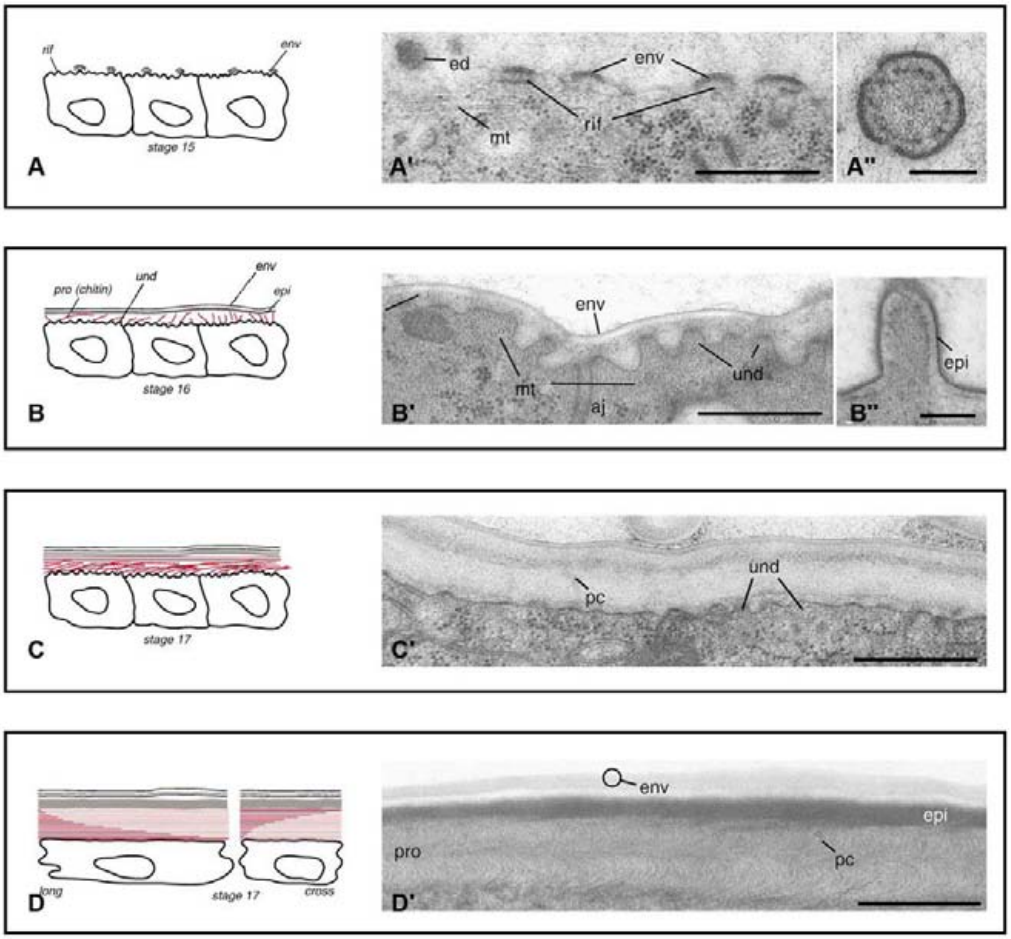
L'ensemble de ces mécanismes assure la définition des différents domaines membranaires, et la formation de différents types de jonctions cellulaires, pour la cohésion et les fonctions spécifiques du tissu épidermique.

2.2 L'épiderme et la sécrétion de la cuticule : une barrière protectrice de l'insecte.

A la fin de l'embryogenèse, les cellules épidermiques sécrètent et assemblent les composants de l'exosquelette recouvrant entièrement la larve : la cuticule. Les cellules épidermiques présentent une très forte activité de biosynthèse. A partir des nutriments du milieu interne captés à la face basale des cellules, une machinerie d'exocytose orientée vers le domaine membranaire apical est mise en place. La cuticule est spécifique aux arthropodes et a sans doute largement contribué à leur succès évolutif. Elle commence à être déposée par les cellules épidermiques embryonnaires dès le stade 15 et jusqu'à la fin de l'embryogénèse. La cuticule est une structure particulièrement complexe et ordonnée, composée de chitine et de nombreuses protéines et lipides (Locke et al., 1994; Moussian et al., 2006). Trois couches distinctes composent la cuticule : la procuticule (en contact avec la membrane plasmique), l'épicuticule, et l'enveloppe (couche la plus externe). Ces différentes couches sont progressivement assemblées à la surface apicale des cellules épidermiques à partir du matériel déversé par les vésicules de sécrétion.

a) <u>L'épiderme : un organe de sécrétion.</u>

Des analyses en microscopie électronique ont permis de révéler une organisation particulière de la région apicale des cellules épidermiques embryonnaires, les *undulae* (figure 10). On a longtemps pensé que ces cellules formaient, comme de nombreuses autres cellules épithéliales, des microvilli apicaux (Locke et al., 1994). En réalité, des coupes obliques à la surface de la cellule montrent que les ondulations de la membrane apicale sont continues et courent perpendiculairement à l'axe A/P de l'embryon. Ces *undulae* semblent maintenues par des microtubules, parallèles mais nécessitent certainement aussi une organisation particulière des filaments d'actine (Moussian et al., 2006). Au stade 14 les cellules présentent une forme colonnaire, allongée selon l'axe apico-basal et « repoussent » leur noyau dans la région



<u>Figure 11 :</u> Formation de la cuticule.

A) Schéma des cellules épidermiques et A') ultrastructure de la cuticule, au stade 15. Les cellules épidermiques commencent à s'aplatir et des petits fragments de l'enveloppe sont assemblés à la surface de la membrane (env). La surface apicale débute son remodelage (rif) et les denticules sont déjà formées. A'') L'enveloppe recouvre la surface des denticules. B) Schéma des cellules épidermique et B') ultrastructure de la cuticule, au stade 16. La membrane cellulaire apicale montre des replis soutenus par le réseau de microtubules (mt), appelés les *undulae* (und). L'enveloppe est continue sur l'ensemble de la surface de l'embryon. B'') L'épicuticule (epi), la couche dense aux électrons commence à se former sous l'enveloppe. C) Schéma des cellules épidermiques et C') ultrastructure de la cuticule, au début du stade 17. Les cellules épidermiques sont désormais cuboïdales. L'épicuticle est maintenant divisée en deux couches, une couche dense aux électrons et une couche translucide aux électrons en contact direct avec l'enveloppe. La procuticule est sécrétée et en contact avec le sommet des *undulae*. D) Schéma des cellules épidermiques et D') ultrastructure de la cuticule, en fin de stade 17. Les cellules épidermiques sont aplaties et la cuticule cesse de s'épaissir. La procuticule atteint son épaisseur maximale et l'orientation des fibres de chitine est maintenant visible. La surface cellulaire est redevenue lisse. Echelle 500 nm dans les coupes transversales et 250 nm pour les denticules. (D'après Moussian et al., 2006)

basale, la région apicale accumulant les organites de synthèse et d'adressage des biomolécules à leur face apicale. Par exemple, de nombreuses mitochondries ainsi qu'un réseau golgien très important sont mis en place à la face apicale. Au stade 15, les *undulae* apicales pourraient permettre d'augmenter et/ou d'orienter spatialement la sécrétion. L'ensemble des transformations de l'organisation cellulaire témoigne de la spécialisation des cellules épidermiques pour la production de la cuticule.

L'épiderme embryonnaire est donc orienté vers la fonction de sécrétion et ceci de manière très active. De manière intéressante, il existe des différences notables entre les cellules lisses et les cellules qui produisent des denticules. Premièrement, la membrane apicale au niveau de la denticule ne présente pas d'*undulae*. Deuxièmement, les différentes couches de la cuticule sont déposées plus rapidement sur la denticule que sur les cellules lisses (Moussian et al., 2006). En effet, la membrane plasmique de la denticule est déjà recouverte par l'enveloppe alors que seul le sommet des *undulae* présente des fragments en cours d'assemblage. Ainsi tout porte à croire que l'assemblage des couches de la cuticule s'effectue en priorité au niveau des cellules émettant des denticules.

b) Formation de la cuticule

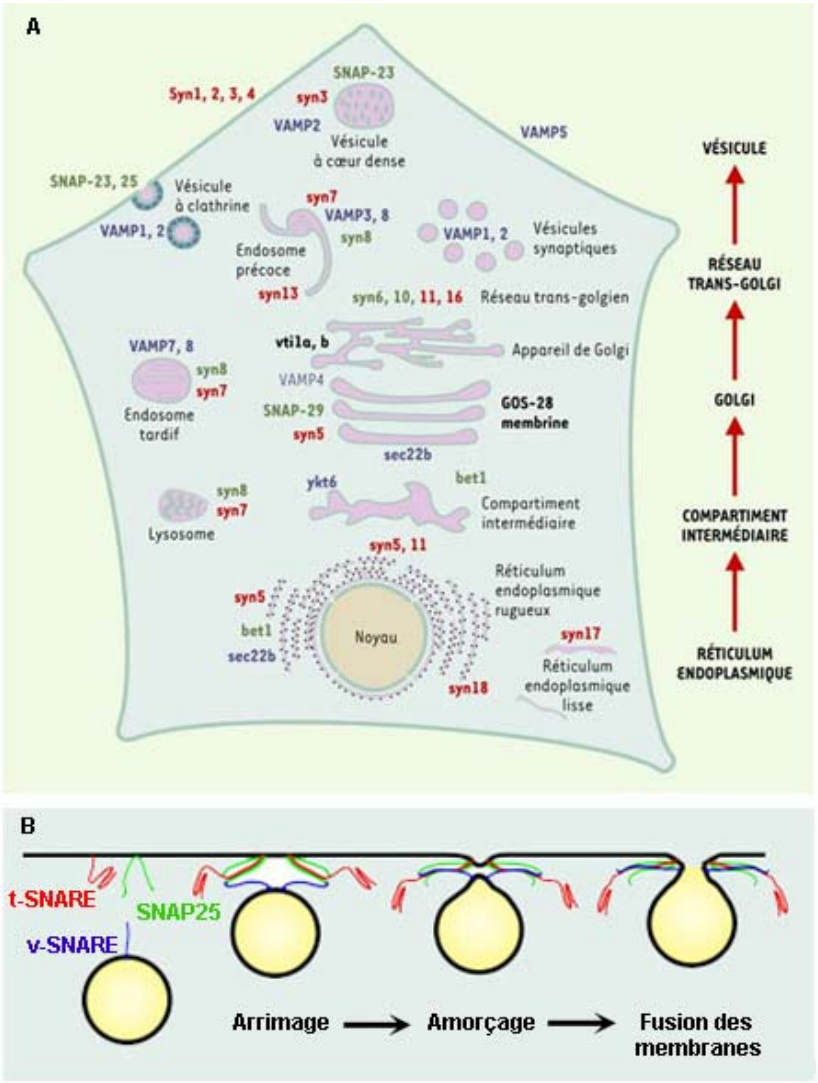
La sécrétion de la cuticule commence par celle de la couche la plus extérieure, l'enveloppe, qui constituera une barrière étanche avec le milieu externe. Ensuite, l'épicuticule est essentiellement composée d'un réseau de protéines, reliées entre elles de manière covalente grâce à l'action de quinones, qui vont réguler la rigidité et la pigmentation de la cuticule. La couche la plus interne, en contact direct avec l'épiderme, est la procuticule, composée de couches successives de chitine organisées en feuillets, les *laminae*. La chitine est déposée avec un angle régulier des fibres entre deux couches successives, générant une organisation en spirale des fibres de chitine de la cuticule (figure 10). On estime généralement que la chitine est le deuxième polymère de sucre le plus abondant en masse sur notre planète, après la cellulose.

C'est au cours du stade 15 que l'enveloppe commence à être sécrétée. Tout d'abord la production de l'enveloppe est discontinue et semble être restreinte au sommet des microvillosités membranaires (figure 11A). Par contraste, la formation de la cuticule au niveau de la denticule apparait continue et synchrone sur tout le pourtour de l'extension cytoplasmique. Au stade 16, l'enveloppe est maintenant presque continue sur toute la surface

de l'embryon (figure 11B). La chitine commence à être déposée sous l'enveloppe pour former la procuticule. L'épicuticule, située entre l'enveloppe et la procuticule, devient distinguable (figure11). Au stade 17, l'épicuticule est maintenant bien visible en dessous de l'enveloppe tout au long de l'embryon et la procuticule commence à s'épaissir (figure 11C). A la surface apicale des cellules, les *undulae* vont finalement se résorber, laissant place à une membrane apicale lisse en contact intime et continu avec la cuticule (figure 11D). Entre le début du stade 17 et l'éclosion de la larve, il s'écoule environ 6h durant lesquelles la cuticule va finir d'être maturée grâce à un épaississement important des trois couches qui la composent.

Les composants de la cuticule et les éventuels régulateurs de leur organisation sont finalement encore très mal connus. La mutation du gène *krotzkopf verkhert* (*kkv*), codant une chitine synthase, cause des défauts sévères de la cuticule, conduisant à son détachement de la membrane apicale (Ostrowski et al., 2002). Lorsqu'on traite les embryons avec du luferon, un inhibiteur de la synthèse de chitine, les mêmes phénotypes sont retrouvés (Moussian, 2008). Trois autres mutations sont connues pour donner des défauts similaires, *retroactive* (*rtv*), *knickkof* (*knk)* et *zeppelin* (*zep*) (Ostrowski et al., 2002). L'analyse ultrastructurale des mutants *knk* et *rtv* montre que les fibres de chitine ne sont plus assemblées dans la procuticule. Rtv est une protéine transmembranaire possédant un domaine potentiel de fixation à la chitine et qui pourrait donc contribuer à son organisation lamellaire (Moussian et al., 2005). Knk est protéine extracellulaire, ancrée à la membrane apicale via une ancre GPI et elle aussi semble indispensable pour la formation de cette structure lamellaire (Moussian et al., 2005). L'identification des composants de la cuticule reste donc un des challenges majeurs dans la compréhension de cette structure spécifique aux arthropodes.

Les arthropodes comprennent notamment les insectes et crustacés et constituent un clade avec les Nématode, les Ecdisozoaires dont le développement s'effectue par une ou plusieurs mues cuticulaires. Le nom du taxon vient du mot ecdysis qui désigne la mue. La cuticule larvaire de la Drosophile a été particulièrement bien étudiée, contrairement aux autres ecdisozoaires. Toutefois, très récemment, la cuticule d'un embryon de crustacé, Parhyale hawaiensis, a été décrite grâce à une analyse en microscopie électronique (Havemann et al., 2008). Cette étude a permis démontrer qu'il existe une grande similitude avec la Drosophile dans la synthèse des différentes couches qui compose la cuticule. Toutefois, à la différence de la Drosophile où la cuticule est uniforme, l'épicuticule et la procuticule ventrale sont différentes de celles en dorsal. L'épicuticule dorsale continue et la procuticule dorsale va



<u>Figure 12 :</u> Localisation des protéines SNARE dans les différents compartiments membranaires d'une cellule type de mammifère.

A) Les membres des quatre familles de SNARE figurent en 4 couleurs. En bleu: les v-SNARE de la famille de la synaptobrévine ou VAMP2, encore appelés R-SNARE à cause du résidu arginine (R) au centre de leur motif SNARE. En rouge: les t-SNARE de la famille de la Syntaxine-1, encore appelés Qa-SNARE à cause du résidu glutamine (Q) au centre de leur motif SNARE. En noir: les t-SNARE de la famille de SNAP-25 (dont le motif SNARE ressemble au motif SNARE N-terminal de SNAP-25), encore appelés Qb-SNARE à cause du résidu glutamine (Q) au centre de leur motif SNARE. En vert: les t-SNARE de la famille de SNAP-25 (dont le motif SNARE ressemble au motif SNARE C-terminal de SNAP-25) encore appelés Qc-SNARE à cause du résidu glutamine (Q) au centre de leur motif SNARE et les t-SNARE qui ont à la fois un domaine Qb et Qc (cas de SNAP-23, 25, 29)

B) Modèle du rôle de protéines de SNARE dans la fusion des vésicules. Un complexe hétérologue est formé par l'association des protéines SNARE de la vésicule et la membrane plasmique (arrimage). Ce complexe rapproche les deux membranes par un mécanisme semblable à celui d'une fermeture éclair (amorçage) Enfin, les deux membranes fusionnent et le contenu de la vésicule est déversé (fusion). (d'Après de Bock JB, 2001).

finalement être subdivisée dans deux couches, l'exo-cuticule dans la partie supérieure et l'endocuticule en dessous. Comme chez la Drosophile, les microfibrilles de chitine et laminae deviennent visible longtemps après la synthèse chitine ait débuté, suggérant que la synthèse et l'assemblage de chitine puissent être des processus séparés (Havemann et al., 2008).

c) Les voies de sécrétion apicale.

La formation de la cuticule requiert une très forte activité sécrétrice, suggérant une spécialisation ou adaptation des machineries du trafic vésiculaire. L'inactivation de Sec61B, un composant central de l'appareil de translocation du réticulum endoplasmique (RE), altère profondément le dépôt de la cuticule, avec notamment l'absence d'épicuticule (Valcarcel et al., 1999). La sécrétion implique un adressage vésiculaire spécifique depuis le RE vers la membrane apicale et on connaît déjà un grand nombre de molécules impliquées dans le trafic vésiculaire (figure 12). Chez les eucaryotes, les protéines SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide–sensitive factor (NSF) Attachment Protein (SNAP) REceptor) permettent la fusion des membranes entre les vésicules des différents compartiments cellulaires au cours de l'exocytose. Ces protéines ont été initialement identifiées pour leur rôle dans l'exocytose des neurotransmetteurs présynaptiques (Jahn and Sudhof, 1999). Cette famille de protéines est composée de différents membres, spécifiques du compartiment cellulaire impliqué : RE, Golgi et membrane cellulaire (pour revue (Jahn and Scheller, 2006). Il existe donc de nombreuses étapes de formation, puis de fusion des vésicules, qui permettent aux protéines de cheminer entre ces différents compartiments cellulaires (figure 12). Le complexe protéique permettant cette fusion est toujours composé par quatre protéines : d'une part les target-SNAREs (t-SNAREs, aussi appelés Q-SNAREs) et deux protéines synaptosome-associed (SNAP) présentes sur la membrane cellulaire, et d'autre part les protéines SNAREs associées aux vésicules (v-SNAREs, aussi appelé R-SNAREs) (figure 12).

La Syntaxin 1A (Syx1A) est une t-SNARE impliquée dans la fusion des vésicules à la face apicale des cellules. Les embryons de drosophile mutants pour *syx1A* présentent une cuticule généralement plus fine et parfois même l'absence d'épicuticule. Si ces mutants ne présentent pas de défauts de production ou de sécrétion de la chitine (Moussian et al., 2007) une altération de la structure lamellaire de la procuticule est cependant notable, suggérant que Syx1A joue un rôle dans l'acheminement de protéines nécessaires à l'assemblage des fibres de chitine au sein de la matrice extracellulaire (Moussian et al., 2007). Pour identifier de

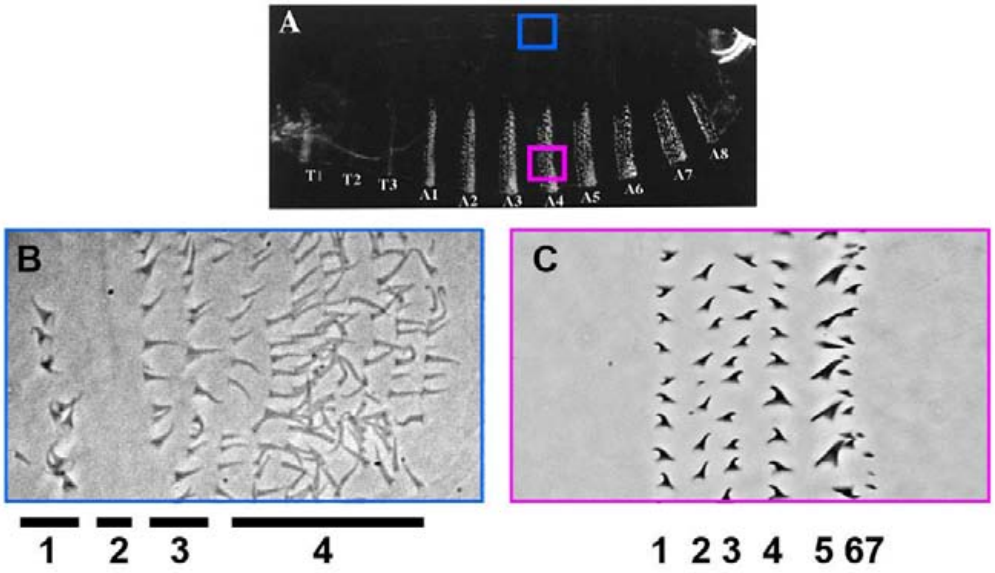


Figure 13 : Patron segmentaire des trichomes.
A) Image d'une larve L1, caractérisée par les ceintures de denticules ventrales. B-C) Grossissement des trichomes de la larve. B) Vue dorsale. Quatre types de cellules sont spécifiés en fonction de leur position A/P sur le segment. Les trichomes de type 1 sont larges, pigmentés et orientés antérieurement. Les cellules de type 2 sécrètent une cuticule nue. Les trichomes de types 3 dont durs et pigmentés mais plus fins que les types 1 et orientés postérieurement. Les trichomes de types 4 sont longs et fins et orientés postérieurement pour les premières rangées et antérieurement pour les rangées suivantes. C) Vue ventrale d'un segment abdominal A4. Les rangées 1 et 4 pointent antérieurement alors que toutes les autres sont orientées postérieurement.

nouvelles protéines SNAREs chez la Drosophile, un crible double hybride a été entrepris pour rechercher des protéines capables de lier directement la protéine alpha-SNAP. Ces travaux ont permis d'identifier les homologues des Syntaxin 5 (Syx5) et 16 (dSyx16) (Xu et al., 2002a; Xu et al., 2002b). Des mutations du gène Syx5 provoquent une accumulation anormale de protéines membranaires dans les compartiments intracellulaires et conduit à la létalité des animaux au stade larvaire (Xu et al., 2002b). Ces données suggèrent que Syx5 joue un rôle important dans la régulation du trafic vésiculaire en route vers le domaine apical. Cependant aucun des mutants identifiés dans ces travaux ne semble affecter la cuticule.

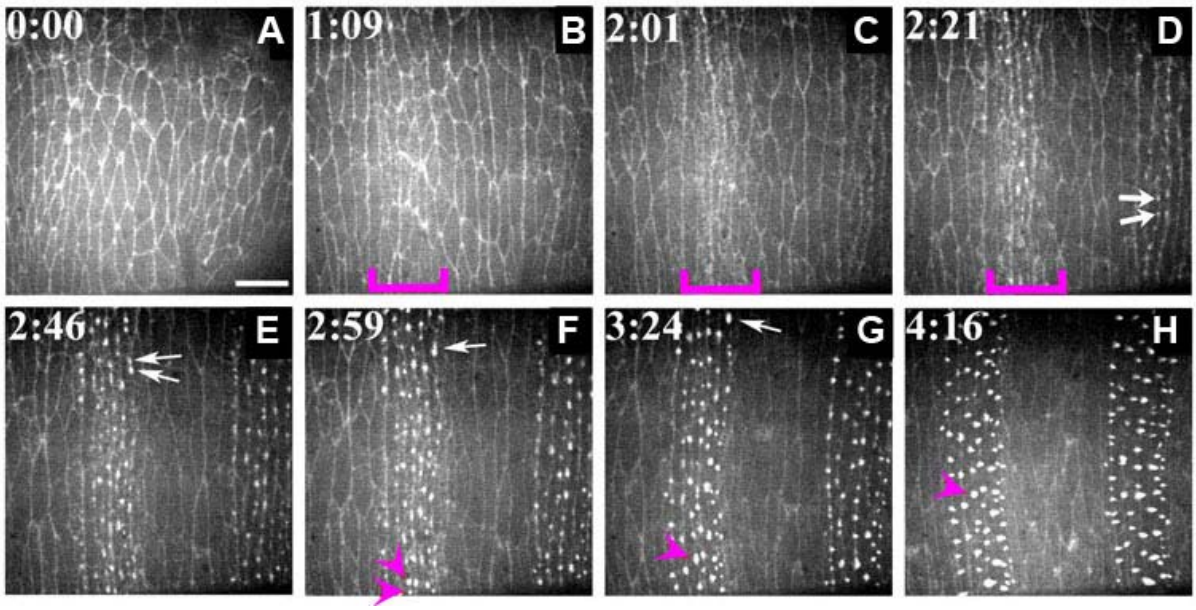
Les mécanismes de sécrétion de la cuticule restent globalement mal compris. Il existe peut-être des acteurs spécialisés, par exemple spécifiques aux arthropodes, rendant plus difficile leur identification. Réciproquement, pour les acteurs génériques du trafic vésiculaire, l'identification de leur rôle pour la synthèse de cuticule peut être gêné par la létalité précoce des embryons, empêchant une analyse spécifique dans les étapes les plus tardives de l'embryogenèse

3. Shavenbaby : le déterminant « ultime » de la morphogenèse cellulaire épidermique.

Dans les deux sections précédentes, nous venons de résumer les grands principes d'une part des mécanismes de spécification des différentes populations de cellules épidermiques et, d'autre part, de la différenciation générale de l'épiderme de drosophile. Au cours de l'embryogenèse ces deux processus sont en réalité largement concomitants et nous allons maintenant évoquer comment leur interaction fonctionnelle aboutit au remodelage de la forme apicale des cellules épidermiques, au cours de leur différenciation terminale.

3.1 Mécanismes cellulaires de la formation des trichomes

Nous avons vu que la détermination du patron des trichomes résulte de nombreuses cascades d'interactions géniques. Les trichomes cuticulaires représentent de robustes extensions cytoplasmiques émergeant de la face apicale de certaines cellules épidermiques. Les trichomes diffèrent dans leur taille et leur forme selon leur position sur le corps de larve, par exemple entre les régions dorsales, où les extensions apparaissent fines et souples et ventrales, où les denticules, qui serviront à la locomotion de la larve, sont larges, rigides et avec une morphologie « en crochet » bien particulière (figure 13).



<u>Figure 14 :</u> Remodelage du cytosquelette d'actine au cours de la formation des denticules.
Image issues d'un film sur un embryon vivant exprimant la Moesin-GFP dans l'épiderme. A) Avant la formation des denticules. B-D) L'accumulation d'actine au niveau du contour cellulaire apical préfigure la future ceinture de cellules à denticules (crochets). D-E) Les foyers de condensation d'actine apparaissent le long de la marge postérieure des futures cellules à denticules (flèches blanches). F-H) Les foyers d'actine se condensent. Flèches blanches, pointes de flèche rouges - fusion de foyers. K) Les denticules commencent l'allongement. Temps en heures:minutes. L'échelle dans la figure A correspond à 10 µm. (D'après de Price et al., 2006)

Les premiers signes de la modification du compartiment apical des cellules épidermiques sont détectables en milieu d'embryogenèse (Guild et al., 2005; Price et al., 2006). Avant le stade 14, les cellules épidermiques présentent toutes une surface apicale convexe et sont très allongées selon l'axe apico-basal (figure 14). L'actine corticale marque alors les jonctions intercellulaires. Dès le début de la fermeture dorsale, les cellules épidermiques vont réorganiser leur forme tridimensionnelle: elles s'aplatissent, s'allongent selon l'axe D/V (figure 5), et s'alignent pour former des rangées régulières (Koppen et al., 2006). Les futures cellules à trichomes continuent de s'allonger selon l'axe D/V et accumulent uniformément des filaments d'actine à la surface apicale (figure 14). L'actine apicale devient rapidement polarisée, avec une restriction des filaments à la marge A/P des cellules (Price et al., 2006). Le réseau d'actine continue de se rassembler en quelques *foci* apicaux par cellule (figure 14), qui vont croître perpendiculairement à la surface apicale (Dickinson and Thatcher, 1997; Price et al., 2006). Ces extensions cellulaires atteignent leur taille maximale en fin de fermeture dorsale, et dans l'épiderme ventral, la formation des denticules s'étale sur environ deux heures (figure 14). Au stade 16, l'épiderme présente ainsi un patron de cellules formant des extensions cytoplasmiques apicales qui préfigure parfaitement celui des trichomes.

Dans chaque rangée cellulaire, en fonction de sa position A/P et D/V, les extensions présentent une polarité, un nombre par cellule, et une forme générale très spécifique. Toutes les extensions des cellules à denticules sont ancrées dans la région la plus postérieure de la face apicale de la cellule, et pointent postérieurement durant les étapes précoces de leur formation. Elles adopteront plus tard leur orientation définitive, avec les rangées 2, 3 et 5 qui pointent vers le postérieur alors que les rangées 1 et 4 pointent vers l'antérieur. En fin d'embryogenèse, une fois la cuticule sécrétée et assemblée, les micro-filaments se désassemblent et/ou dépolymérisent. La forme particulière de chaque denticule apparaît donc résulter du moulage de la cuticule sur la membrane apicale, maintenue par une structure d'actine transitoire.

En résumé, le patron des trichomes correspond à un programme de remodelage localisé de la forme apicale de certaines cellules épidermiques, impliquant la réorganisation du cytosquelette d'actine.

3.2 Régulateurs du cytosquelette dans la forme apicale des cellules à trichomes

Certaines mutations produisant des phénotypes anormaux des soies sensorielles adultes affectent également les trichomes larvaires. Plusieurs gènes incluant *forked (f)*, *multiple wing hairs* (*mwh*), *hairless* (*H*) *singed (sn)* et *javeline* (*jv*) participent à la formation des extensions

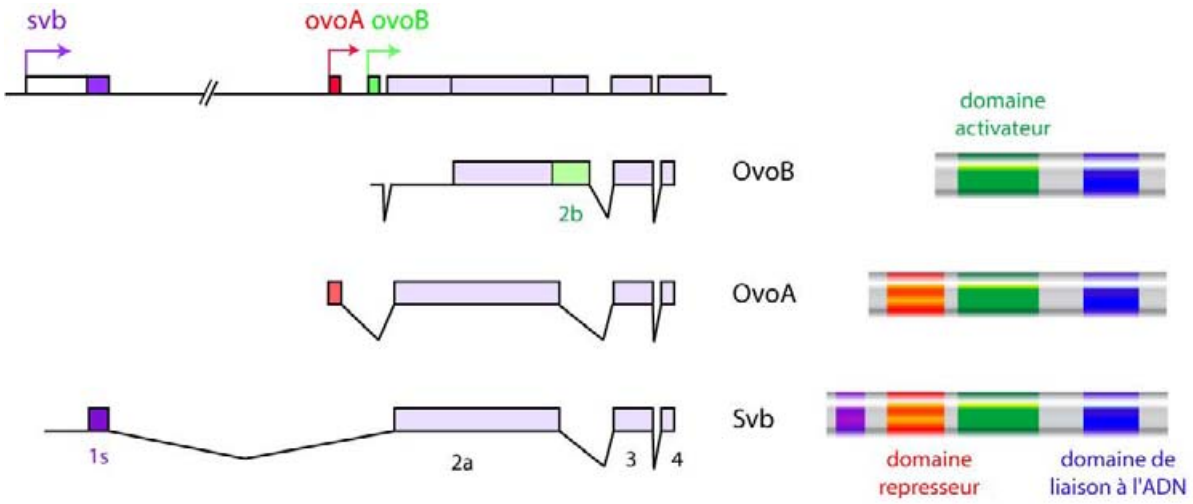
épidermiques riches en filaments d'actine (Dickinson and Thatcher, 1997). Cependant la mutation de chacun de ces gènes peut présenter des effets différents suivant les populations de cellules épidermiques. Par exemple, l'absence de *H* affecte les trichomes dorsaux mais apparemment pas les denticules. Les mutants *jv* ont des denticules plus fines et allongées, particulièrement pour les rangées 1 et 2 (Dickinson and Thatcher, 1997). D'autres protéines capables de se lier à l'actine et impliquées dans la régulation du cytosquelette ont pu être identifiées pour leur fonction dans la formation des extensions épidermiques. Diaphanous (Dia) appartient à la famille des Formines qui régulent la polymérisation de l'actine et participent à l'élongation des microtubules (pour revue (Zigmond, 2004). La protéine Dia se localise très tôt au cortex des cellules épidermiques ; elle va ensuite se redistribuer à la base et à l'intérieur des denticules naissantes, mais avec un marquage plus punctiforme que celui de l'actine-F (Price et al., 2006). Le complexe protéique Arp2/3 permet la nucléation des filaments d'actine, créant ainsi des branchements sur lesquelles de nouveaux filaments seront initiés (pour revue (Pollard and Borisy, 2003). Au cours de l'extension de la bandelette germinale, Arp3 est localisé aux bordures cellulaires ainsi que dans le cytoplasme, puis il se concentre lui aussi à la base des extensions naissantes, avant de se localiser le long des trichomes (Price et al., 2006). APC2 est un régulateur de l'organisation des cytosquelettes d'actine et/ou de microtubules (McCartney et al., 1999). Dès l'initiation de la réorganisation apicale des cellules à trichomes, APC2 colocalise avec les filaments d'actine en cours d'élongation (Delon et al., 2003; Price et al., 2006).

La formation des trichomes repose donc sur le contrôle polarisé de l'organisation du cytosquelette d'actine corticale, impliquant différents facteurs de régulation de la polymérisation des filaments et de leur assemblage en faisceaux.

3.3 Shavenbaby, un niveau supplémentaire de régulation transcriptionnelle.

Nous venons de voir ici que la formation des trichomes repose sur la réorganisation du cytosquelette, et précédemment nous avons présenté les cascades de régulations transcriptionnelles déterminant quelles cellules épidermiques formeront des trichomes. Comment ces deux mécanismes sont-ils fonctionnellement reliés au sein de chaque cellule ?

Dans le cas de la formation des denticules, nous avons vu que les réseaux de régulation du développement précoce mettent en place un ensemble de signalisations cellulaires, notamment Wnt et EGF-r/Notch, contrôlant respectivement les destins morphogénétiques « lisse » ou



<u>Figure 15 :</u> Locus Ovo/Svb et facteurs de transcription associés.
Organisation moléculaire du locus et des protéines Ovo/Svb. Les trois transcrits sont initiés depuis des promoteurs indépendants (flèches), un promoteur somatique (*svb*) et deux promoteurs germinaux (*ovoA* et *ovoB*). Les transcrits sont représentés avec en gris les exons communs et en couleur les exons *svb* ou *ovo*-spécifiques. Les protéines sont représentées avec les différents domaines fonctionnels. En vert le domaine d'activation, en rouge le domaine de répression et en bleu le domaine de liaison à l'ADN. Le transcrit de *svb* possède un exon supplémentaire (en violet) et rallonge la protéine en N-terminal d'un domaine dont la fonction est inconnue (en violet).

« denticule ». Wg spécifie le destin des cellules lisses. En effet, en absence de *wg* l'épiderme embryonnaire est recouvert de denticules et, réciproquement, l'expression ubiquiste de Wg conduit à ce que toutes les cellules épidermiques ventrales adoptent un destin « lisse ». La signalisation Wnt met cependant en oeuvre deux voies distinctes: la voie dite canonique (qui nécessite l'activité de la β-Catenine, (ou Armadillo chez la drosophile) et la voie non canonique, indépendante de la β-Catenine. La spécification des cellules lisses par Wg dépend de la β-Catenine, et nécessite, de plus, la fonction de *pangolin* (d-TCF). Cette protéine est un partenaire physique de la β-Catenine qui agit comme un co-facteur transcriptionnel. De la même façon, la fonction de *pygopus*, un autre membre du complexe d'activation transcriptionnelle de la voie Wg est aussi indispensable à la spécification des cellules lisses (Hoffmans and Basler, 2007).

Ces données montrent donc la nécessité d'une nouvelle étape de régulation de la transcription, en aval des voies de signalisation. Un résultat fondateur de l'équipe a été la démonstration que les voies Wg et EGF-r ont une action antagoniste sur la transcription d'un gène cible commun, *shavenbaby (svb)* (Payre et al., 1999).

Les premières mutations du gène *svb* ont été initialement identifiées au cours du crible « historique » visant à identifier de gènes influant sur le patron des trichomes (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Les embryons mutants pour *svb* présentent une cuticule lisse, avec l'absence générale des denticules et les trichomes dorsaux, un phénotype à l'origine du nom (bébé rasé). Ce gène code un facteur de transcription à doigt de zinc spécifiquement exprimé dans chacune des cellules épidermiques qui vont former des denticules ou des trichomes dorsaux (Delon et al., 2003; Garfinkel et al., 1994; Mevel-Ninio et al., 1995). Réciproquement, l'expression ectopique de *svb* dans des cellules épidermiques normalement lisses est suffisante pour les forcer à former des extensions, quelque soit le statut des voies de signalisation Wg ou EGF-r (Payre et al., 1999).

svb fait partie du locus *ovo*/*svb*, contrôlant à la fois la différenciation de la lignée germinale (Ovo) et celle de l'épiderme (Sbv). Ce locus dirige l'expression de plusieurs transcrits qui codent tous des facteurs de transcription partageant le même motif de liaison à l'ADN, composé de quatre doigts de zinc. Les fonctions du gène *ovo*/*svb* correspondent à des promoteurs indépendants: un promoteur somatique pour la fonction *svb* et deux promoteurs germinaux permettant la synthèse des isoformes OvoA et OvoB (figure 15). OvoA et OvoB

sont exprimées de manière différentielle au cours du développement ovarien. Le promoteur ovoB est actif tout au long de l'ovogenèse, alors que le promoteur spécifique d'OvoA se met en route à la fin du processus de l'ovogenèse. (Mevel-Ninio et al., 1995; Salles et al., 2002). Les deux isoformes possèdent de plus des fonctions moléculaires antagonistes, OvoB est un activateur de la transcription alors qu'OvoA agit comme répresseur de la transcription des mêmes gènes cibles. OvoB est la forme la plus courte produite par le locus et possède, en plus de son domaine de fixation à l'ADN, un domaine trans-activateur (figure 15). La partie N-terminale additionnelle d'OvoA rajoute un domaine répresseur « dominant » (en rouge figure 15) qui vient contrecarrer l'action du domaine trans-activateur, produisant ainsi un répresseur de la transcription (Andrews et al., 2000).

Dans l'épiderme embryonnaire, le promoteur *svb* présente un pic transitoire d'activité entre les stades 12 et 15. Le transcrit *svb* code l'intégralité de la séquence OvoA, à laquelle s'ajoute un exon additionnel étendant encore l'extrémité N-terminale de la protéine (figure 15). L'expression ectopique d'OvoB, comme celle de Svb, est suffisante pour induire la formation de denticules. Par contraste, l'expression dirigée d'OvoA dans les cellules à denticules les transforme en cellules lisses, montrant ainsi une action dominante négative du répresseur OvoA vis-à-vis de la fonction endogène de *svb*. Ces données suggèrent que Svb possède une fonction activatrice et que les trois isoformes *ovo/svb* sont capables de se lier aux mêmes cibles génomiques, quand ils sont exprimés dans les mêmes cellules. En absence de *svb* (ou suite à l'expression artificielle d'OvoA), ni les extensions épidermiques, ni les faisceaux de filaments d'actine ne sont formés. En réalité, aucun signe des étapes mêmes précoces de la réorganisation du cytosquelette n'est détectable en absence de Svb. Réciproquement, l'expression ectopique de *svb* est capable d'induire la formation d'extensions apicales dans les cellules lisses. Svb apparaît donc comme nécessaire et, au moins en partie, suffisant pour induire la formation des extensions des cellules épidermiques *via* la réorganisation du cytosquelette d'actine (Delon et al., 2003).

L'ensemble de ces données démontraient (Payre et al., 1999) donc que l'hypothèse d'un lien direct entre les voies de signalisation cellulaire et la réorganisation du cytosquelette des cellules à trichomes est une fausse piste (voie Wg non canonique). En résumé le contexte scientifique à l'origine de mon arrivée au laboratoire. Tous les gènes connus pour modifier le patron des cellules à trichomes agissaient pour contrôler collectivement l'expression de *svb* dans les cellules épidermiques (Payre, 2004). De plus, des études évolutives montraient que des variations du profil des trichomes entre différentes espèces étaient due, encore une fois, à la modification de l'expression du gène *svb* (Delon and Payre, 2004; Sucena et al., 2003;

Sucena and Stern, 2000). Tous ces résultats suggéraient donc que le facteur de transcription Svb constituerait le régulateur « le plus en aval » des réseaux de régulation génique déterminant la formation des trichomes.

Pour contribuer à comprendre les mécanismes du contrôle génétique de la morphogenèse cellulaire, j'ai participé l'identification des gènes cibles de *svb*, le décryptage des mécanismes de leur régulation transcriptionnelle et surtout j'ai orienté plus particulièrement mes travaux sur l'analyse fonctionnelle d'un sous groupe d'entre eux, codant des protéines Zona-Pellucida, dans les étapes intimes du remodelage de la forme cellulaire.

RESULTATS

I. Les cibles de Svb

RESUME

La morphogenèse contrôle l'acquisition de la forme tridimensionnelle des cellules et des tissus grâce à l'établissement de programmes spécifiques au cours de l'embryogénèse. Toutefois, les mécanismes et les acteurs moléculaires impliqués dans ce processus de morphogenèse restent encore très mal connus.

Nous avons abordé cette question en étudiant la différenciation morphologique de l'épiderme chez la *Drosophile*, dirigée par un circuit bien connu de régulateurs menant à un patron stéréotypé de cellules lisses et des cellules formant des extensions riches en actine, les trichomes. Notre équipe avait montré que le facteur de transcription Shavenbaby (Svb) joue un rôle central dans la formation des trichomes. Pour comprendre ce mécanisme de différenciation morphologique, nous avons recherché les cibles de Svb. Nous montrons ici que Svb contrôle la forme des cellules épidermiques grâce à l'activation transcriptionnelle de différentes classes d'effecteurs cellulaires, contribuant directement à l'organisation de filaments d'actine, de la matrice extracellulaire et à la modification de la cuticule. L'inactivation individuelle de chacun de ces gènes cibles produit des défauts distincts de la forme des trichomes. En conclusion, nos données montrent que Svb gouverne un module évolutivement conservé et responsable de l'activation de gènes impliqués collectivement dans la formation des trichomes, établissant pour la première fois le lien moléculaire entre les réseaux de régulation génique et un programme de contrôle localisé de la forme cellulaire.

OPEN ACCESS Freely available online PLoS BIOLOGY

Shavenbaby Couples Patterning to Epidermal Cell Shape Control

Hélène Chanut-Delalande[☯¤], Isabelle Fernandes, Fernando Roch, François Payre[*], Serge Plaza[☯*]

Centre de Biologie du Développement, CNRS UMR5547, Université Paul Sabatier , Toulouse, France

It is well established that developmental programs act during embryogenesis to determine animal morphogenesis. How these developmental cues produce specific cell shape during morphogenesis, however, has remained elusive. We addressed this question by studying the morphological differentiation of the *Drosophila* epidermis, governed by a well-known circuit of regulators leading to a stereotyped pattern of smooth cells and cells forming actin-rich extensions (trichomes). It was shown that the transcription factor Shavenbaby plays a pivotal role in the formation of trichomes and underlies all examined cases of the evolutionary diversification of their pattern. To gain insight into the mechanisms of morphological differentiation, we sought to identify *shavenbaby*'s downstream targets. We show here that Shavenbaby controls epidermal cell shape, through the transcriptional activation of different classes of cellular effectors, directly contributing to the organization of actin filaments, regulation of the extracellular matrix, and modification of the cuticle. Individual inactivation of *shavenbaby*'s targets produces distinct trichome defects and only their simultaneous inactivation prevent trichome formation. Our data show that *shavenbaby* governs an evolutionarily conserved developmental module consisting of a set of genes collectively responsible for trichome formation, shedding new light on molecular mechanisms acting during morphogenesis and the way they can influence evolution of animal forms.

Citation: Chanut-Delalande H, Fernandes I, Roch F, Payre F, Plaza S (2006) Shavenbaby couples patterning to epidermal cell shape control. PLoS Biol 4(9): e290. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040290

Introduction

A general feature of development is the control of tissue and cell morphogenesis, a process whereby each cell acquires a specific shape depending upon its individual identity. Although the mechanisms that permit the patterning of a cellular field are now relatively well understood in different systems, how cell fate becomes translated into cell-shape control remains largely unknown.

Genetic analysis of epidermal differentiation in *Drosophila* has made this process a paradigm for our attempts to understand the subsequent steps of morphogenesis in animals. During early embryogenesis, cascades of transcription factors progressively refine the different cellular territories and define their respective identity [1]. Signaling pathways then act to establish boundaries between adjacent cell fields (reviewed in [2,3]) and participate in the regulation of the size of these territories through the control of cell survival [4]. Finally, when the epidermis is composed of a monolayer of post-mitotic cells, signaling pathways specify cell fates, ultimately determining morphological differentiation [1,2,5]. Epidermal cells in a given embryonic segment display a stereotyped pattern of two distinct morphological fates: cells with a smooth apical surface, which generate naked cuticle, and cells producing actin-rich cytoplasmic extensions, which eventually become the mature larval microtrichiae or trichomes, generally called denticles (ventral) and hairs (dorsal).

In the ventral region of the abdomen, each segment possesses six to seven rows of pigmented denticles, which are involved in locomotion. Activation of the Wingless (Wg) pathway determines the naked fate [6], whereas activation of the d-EGF-receptor (DER) pathway promotes denticle formation [7]. In addition, Serrate-Notch signaling also contributes to define the denticle field [8,9] through a fine-tuning of the extent of DER activation [10]. The activities of Wg and DER pathways on epidermal differentiation converge in the transcriptional regulation of *shavenbaby (svb)* [11]. DER activates *svb* transcription in denticle-forming cells, whereas Wg acts as a repressor in the naked territories (Figure 1A), leading to the precise expression of *svb* in denticle cells. In turn, *svb* is required for denticle formation, since *svb* mutants display essentially naked cuticle. In addition, the ectopic expression of *svb* in smooth cells is sufficient to produce cuticular extensions [11], which nevertheless do not display the typical morphology of denticles, likely because those cells lack auxiliary factors involved in the fine shaping of these structures. *svb*, which encodes a zinc finger transcription factor [12–14], is the most-downstream regulator so far known to specify the denticle pattern [11].

Additional evidence supports the hypothesis that, whereas all other upstream regulators act to define epidermal cell fates, *svb* controls epidermal cell shape changes. Although different mechanisms specify morphological fates in the

Academic Editor: Alfonso Martinez Arias, Cambridge University, United Kingdom

Received February 23, 2006; **Accepted** June 28, 2006; **Published** August 22, 2006

DOI: 10.1371/journal.pbio.0040290

Copyright: © 2006 Chanut-Delalande et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abbreviations: bp, base pair; kb, kilobase; 0.4KminKO, 0.4Kmin knockout

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: plaza@cict.fr (SP); payre@cict.fr (FP)

☯ These authors contributed equally to this work.

¤ Current address: Biozentrum der Universität Basel, Basel, Switzerland

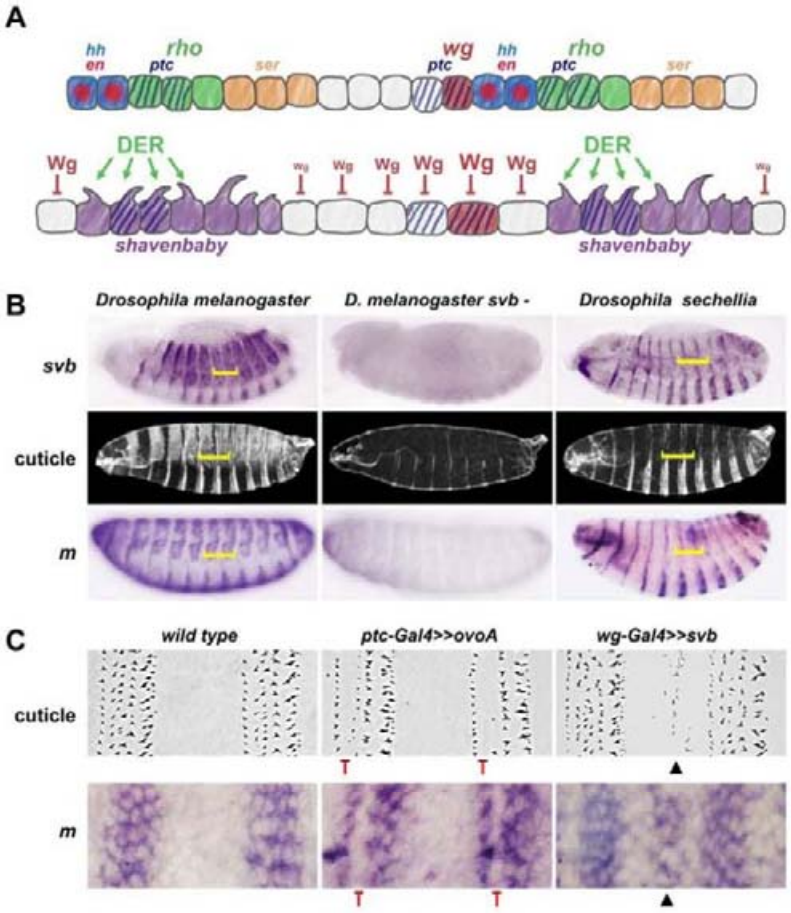


Figure 1. Control of *m* Expression by *svb* in the Embryonic Epidermis

(A) Schematic representation of the signaling pathways that control morphological differentiation of the ventral embryonic epidermis, at stage 12 (top) and at the end of embryogenesis (bottom); anterior is to the left. In addition to *engrailed (en)*, posterior cells express *Hedgehog (Hh)*, and *patched (ptc)* is expressed in a two-cell-wide stripe on each side of the *Hh*-expressing cells. *Hh*, together with *serrate (Ser)*, activates *rhomboid (Rho)* expression in a three-cell wide stripe. The Rhomboid protease activates the ligand of the d-EGF receptor (DER), whose activation triggers the expression of *svb*, resulting in the formation of six to seven rows of denticles. Wingless, which is expressed in the posterior-most row of anterior cells, diffuses asymmetrically and represses *shavenbaby* transcription to form naked cuticle.

(B) Whole-mount in situ hybridization of *svb* (top) and *m* (bottom) mRNA; cuticles are shown in the middle panels. Inactivation of *svb* prevents the formation of most trichomes and abolishes *m* epidermal expression. *m* expression foreshadows the pattern of trichomes in *D. melanogaster* and *D. sechellia* larvae. Yellow brackets outline two dorsal segments.

(C) Close-up of the cuticle region corresponding to the third (A3) and fourth (A4) abdominal segments (top) and *m* mRNA distribution (bottom), in wild-type *D. melanogaster* embryos (left), ptc-Gal4-driven expression of UAS-OvoA (middle) and expression of UAS-*svb* under the control of wg-Gal4 (right). Whereas in wild type, *m* is expressed in each segment in a five to seven–cell-wide stripe, the expression of OvoA prevents the formation of denticle rows 2–3 and represses *m* expression in the corresponding cells (red lines). Reciprocally, ectopic expression of *svb* in *wg* cells triggers the formation of supernumerary denticles and ectopic expression of *m* (arrowheads).

DOI: 10.1371/journal.pbio.0040290.g001

dorsal epidermis [15], *svb* is required for the formation of dorsal hairs as it is for denticles. It has been shown that the modification of *svb*, leading to the restriction of its expression in a subset of dorsal epidermal cells, is the unique cause of the modification of the trichome pattern in a sibling *Drosophila melanogaster* species, *D. sechellia*, in which several rows of dorsal hairs are replaced by naked cuticle [16]. Somewhat surprisingly, given the large number of genes that are theoretically capable of modifying dorsal hair patterning [1], all cases of dorsal hair–pattern evolution examined in dipterans are the consequence of the modification of *svb* expression only [16–18]. Thus, developmental and evolutionary studies show that *svb* is critical for epidermal differentiation and that the presence/absence of *svb* expression ultimately determines the pattern of denticles and dorsal hairs [19].

How does *svb* control the formation of denticles and dorsal hairs during epidermal differentiation? Little is known about the cellular mechanisms underlying trichome formation. Epidermal cells are highly polarized along the apico-basal axis, with actin microfilaments accumulating at the cell cortex where they interact with apical junction complexes [20,21]. The formation of denticles and dorsal hairs is initiated by F-actin accumulation and reorganization, leading to the production of an apical bundle in the posterior region of

the cell [14,22,23]. Each bundle then grows perpendicularly to the apical cell surface [22,23] and probably provides the mechanical force for the modification of the apical membrane. At later stages, ecdysteroid hormones induce epidermal cells to synthesize components of the cuticular envelopes, which are modified by the catecholamine biosynthetic pathway to ensure trichome pigmentation and hardening [24]. Despite the large number of genetic screens based upon cuticle observation [25,26], the molecular mechanisms responsible for the different steps of epidermal differentiation still remain to be uncovered.

Since *svb* activity acts cell autonomously to promote denticle formation [11,14], we searched for genes whose expression is controlled by *svb* as an alternative approach to identify players responsible for the morphological differentiation of epidermal cells. We identified several cellular factors involved directly in subsequent steps of denticle formation. Although actin remodeling is generally regarded as the outcome of post-translational modifications, we show that denticle formation relies on the *svb*-dependent transcriptional activation of several factors involved in microfilament formation or bundling. We provide evidence that *svb* directly controls the transcription of *miniature (m)*, which encodes a membrane protein containing a Zona Pellucida (ZP) domain, and we show that *m* is required for the membrane/cuticle interaction in the denticle. We also identified a *svb* target responsible for denticle pigmentation, therefore demonstrating that *svb* coordinates several aspects of denticle differentiation. Finally we show that *svb* regulates the same set of genes for the formation of dorsal hairs and suggest that the evolution of the dorsal hairs pattern in *D. sechellia* results from the concerted modification of the expression of cellular effectors regulated by *svb*.

Results

svb Directs *m* Expression in the Embryonic Epidermis

As a first step towards identifying players involved in denticle formation, we searched for genes expressed in epidermal cells by conducting a systematic survey of expression patterns available from the Berkeley Drosophila Genome Project [27] and the literature (Table S1). Among the approximately 400 genes reported to be transcribed in the epidermis, we found that only a small number (<10%) are expressed in a segmentally repeated pattern, at a time of epidermal cells morphological differentiation. We further analyzed the epidermal expression of these genes by in situ hybridization and tested for its dependence on *svb* (Table S1). We first focused on *m* [28], because its expression in stage-15 embryos strikingly resembles the trichome pattern, which is specified by *svb* at previous stages (Figure 1B).

We found that *m* expression in epidermal cells is abolished in *svb* mutant embryos (Figure1B), showing that *svb* is required for *m* transcription in the epidermis. Detailed examination (Figure 1C) revealed a precise correlation between *m* expression and the denticle pattern in wild-type embryos, with a six to seven–cell-wide expression stripe in each segment that alternates with a band of *m*-negative cells. OvoA is a germinal isoform of the *ovo/svb* gene that acts as a transcriptional repressor [13], able to counteract *svb* activity when its expression is artificially directed in the epidermis [13,14]. When expressed in *ptc*-expressing cells (see Figure 1A), OvoA leads to the replacement of denticle rows 2 and 3 by a stripe of naked cuticle interrupting each denticle belt (Figure 1C). This OvoA expression also represses *m* transcription in the epidermal cells corresponding to denticle rows 2 and 3, providing evidence that *svb* activity is required cell autonomously for *m* expression in denticle cells. To test whether *svb* is sufficient to induce *m* expression in the epidermis, we examined the consequence of the ectopic expression of *svb* in smooth cells. Ectopic expression of *svb* in *wg*-expressing cells (Figure 1A) causes the formation of a supernumerary row of cuticular extensions and leads to an ectopic stripe of *m* expression (Figure 1C), showing that *svb* is sufficient to trigger *m* transcription in epidermal cells.

As the evolutionary loss of dorsal trichomes in *D. sechellia* embryos is the result of the restriction of *svb* expression to narrow stripes in dorsal epidermal cells [16], we asked whether *m* expression was modified accordingly in *D. sechellia*. When compared to *D. melanogaster*, *m* expression in *D. sechellia* embryos is indeed seen to be restricted to narrow bands in the dorsal region. These data thus bring independent support to the conclusion that *m* expression is controlled by *svb* in the embryonic epidermis and show that this regulation has been evolutionarily conserved.

All together, our results demonstrate that *svb* activity is necessary and sufficient to control *m* expression specifically in epidermal cells producing denticle and dorsal hairs.

Shavenbaby Directly Controls Miniature Transcription

To investigate whether *svb* directly regulates *m* expression, we first attempted to identify *cis*-regulatory elements directing *m* transcription in the embryonic epidermis.

We generated transgenic lines in which a reporter gene is placed under the control of a 6-kilobase (kb) genomic region encompassing the *m* transcriptional start site (6Kmin) (see Figure 2A). These 6Kmin reporter transgenes faithfully reproduce *m* expression in late embryos (Figure 2B and 2C) and display a similar dependence on *svb* activity (unpublished data). Deletion of most intronic sequences to a 3-kb fragment leads to a strong diminution of the expression (Figure 2D), showing that *cis*-regulatory elements required for *m* epidermal expression are located in intronic regions. We focused on a 0.4-kb region from the second *m* intron, which is highly conserved in Drosophilidae (Figure 2A). This fragment, when placed upstream of a minimal promoter, promotes a robust expression in the epidermis (Figure 2E), similar to that of the endogenous *m* gene (Figure 2B–2H). Expression of 0.4Kmin lines is lost in a *svb* mutant background (Figure 2F), whereas an additional stripe of expression appears when *svb* is ectopically expressed in smooth cells (Figure 2G). Therefore, this 0.4-kb region of the *m* gene behaves as a *svb*-responsive element, able to drive epidermal expression under the control of *svb*.

We then assayed the ability of the Svb protein to bind in vitro to the corresponding DNA region. Gel retardation assays showed that the recombinant Svb protein binds specifically to the 0.4-kb *m* element through a single region, further refined to a 200-base pair (bp) fragment (Figure 2I). Sequence analysis revealed the presence of a nucleotide motif matching (7/7) the consensus binding site previously defined for Ovo proteins [29], which share the same DNA binding domain with Svb [12]. Additional DNA-binding experiments showed that Svb binds to this predicted site with a high affinity (estimated Kd = 2.5 ± –0.8 nM, unpublished data).

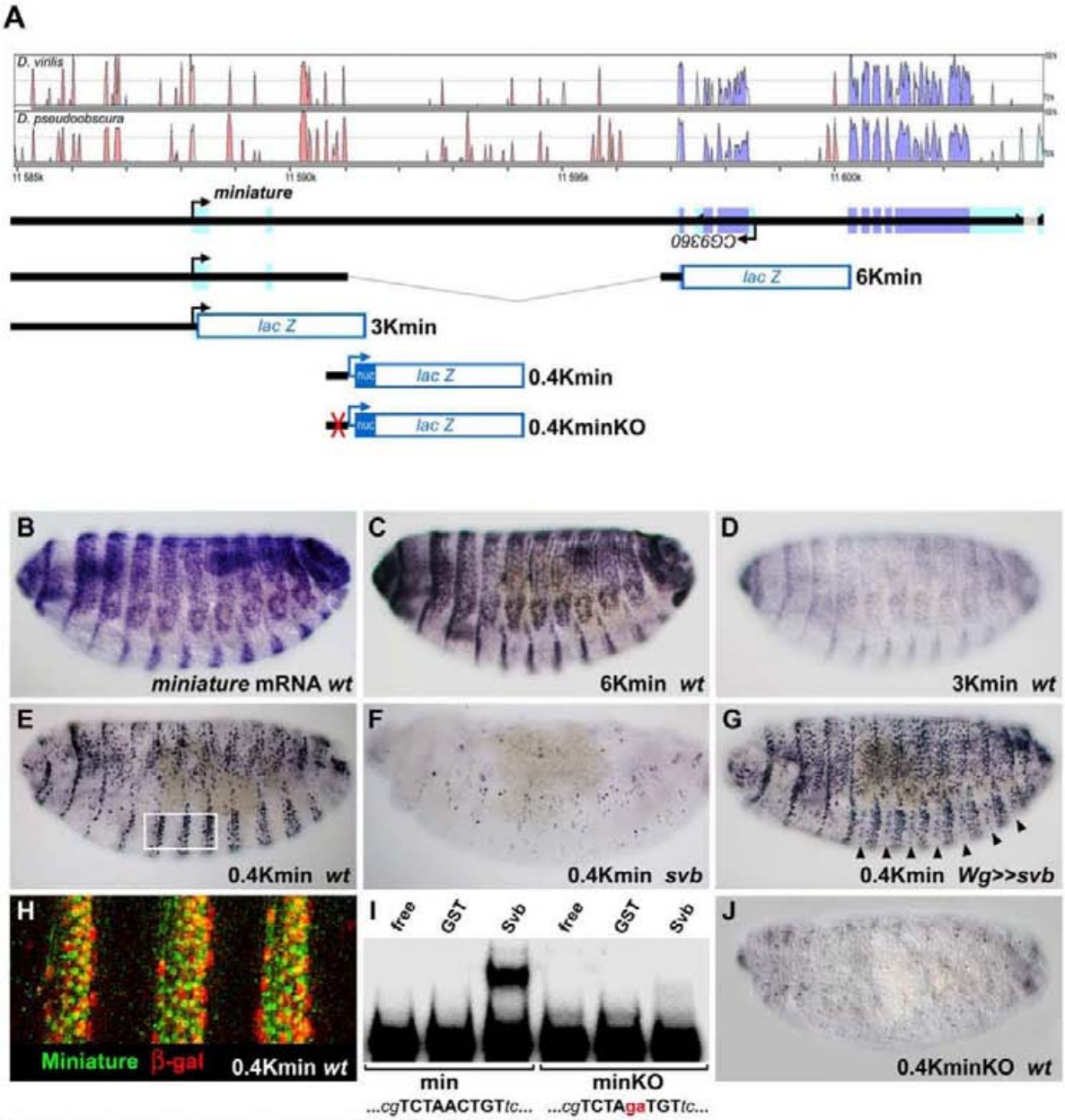


Figure 2. An Evolutionarily Conserved Enhancer Directs the *svb*-Dependent Expression of *m*

(A) Evolutionary conservation of the *m* locus and summary of transgenic reporter constructs. Transcribed regions of *m* span more than 15kb and harbor an unrelated gene, *CG9360*, transcribed from the complementary stand. Histograms plot the level of sequence conservation between *D. melanogaster* and *D. pseudoobscura* (top) or *D. virilis* (bottom), as represented from the Vista Genome Browser package. Red, light blue, and dark blue peaks correspond to conserved sequences in non-coding regions, 3′ and 5′ UTR, and translated sequences, respectively. Genomic regions displaying high evolutionary conservation were fused with reporter LacZ genes, encoding either a cytoplasmic (6Kmin and 3Kmin) or nuclear (0.4Kmin) β-gal enzyme, and used to generate transgenic lines.

(B and C) Compared to *m* mRNA (B), 6Kmin constructs reproduce endogenous *m* expression (C).

(D) Deletion of intronic sequences leads to a strong reduction of staining in 3Kmin constructs.

(E) The 0.4Kmin construct drives *m*-like epidermal expression at a high level. The white box indicates the ventral region selected for the close-up presented in panel (H).

(F and G) Like the endogenous gene, this enhancer is responsive to *svb*, since staining is absent in *svb* mutants (F) and additional stripes are produced after *svb* ectopic expression (arrowheads) (G).

(H) Close up of the ventral region (segments A3–A5) of a 0.4Kmin embryo, showing that the β-gal reporter (red) is co-expressed with endogenous Miniature protein (green) in epidermal cells.

(I and J) Electrophoresis mobility shift assays show the specific binding of the Svb protein to wild-type *m* enhancer. Introduction of 2 point mutations prevents in vitro binding (I) and leads to an inactive enhancer when assayed in vivo (J). Sequence of the Svb binding site (capital letters) and introduced mutations (red) are indicated.

DOI: 10.1371/journal.pbio.0040290.g002

The sequence of this Svb binding site on the *m* enhancer (at position chrX:11487686, on the genomic scaffold) is conserved in all sequenced *Drosophila* species. Introduction of point mutations that substitute two invariant nucleotides found in all Ovo binding sites [29] eliminates Svb binding in vitro (Figure 2I), showing that Svb interacts specifically with the *m* enhancer through this single binding-site. To test the consequence of preventing Svb binding in vivo, we introduced these two mutations into the 0.4-kb enhancer construct and generated corresponding transgenic lines (0.4KminKO). All the tested 0.4KminKO lines (12) lost *m*-like epidermal expression, with only some variable residual staining, variable from line to line (Figure 2J).

These results demonstrate that Svb binds to an evolutionarily conserved element of the *m* gene, which behaves as a *svb*-responsive enhancer in the embryonic epidermis. Mutations preventing Shavenbaby binding to this element abolish its enhancer activity, thus providing strong evidence that Svb exerts a direct control on *m* transcription.

Miniature Is Required for Denticle Formation

m encodes a membrane protein [30], which has recently been implicated in actin-based remodeling of wing cell shape during metamorphosis [28,31]. To examine whether *m* also plays a role in embryonic epidermal cells, we analyzed consequences of *m* inactivation on denticles.

Although the absence of *m* does not affect the denticle pattern, detailed examination shows that denticles are altered in *m* mutant embryos (Figure 3). In wild type, each denticle row has a characteristic morphology, but all denticles share a common organization resembling a rose thorn: a large base, followed by a median constriction forming a narrow neck, which supports the distal hook, which points either anteriorly or posteriorly (Figure 3). In larvae carrying the m^1 loss-of-function mutation, or the *Df(1)m-MR* deficiency that deletes the entire *m* gene [28], denticles are small and misshapen (Figure 3 and Table S2); the median constriction is absent, leading to poorly differentiated denticles that display an aberrant triangular shape. These mutant defects are rescued when *m* is re-expressed using the wild-type 0.4Kmin element as a GAL4 driver (Figure 3A). These results provide additional evidence that this *m* enhancer is fully functional in the epidermis and demonstrate that the observed denticle defects are due to the loss of *m* activity.

To further investigate the role of *m* in denticle formation, we tested the influence of its ectopic expression in wild-type embryos. We used both an EP (target P-element) insertion located 2 kb upstream of the *m* start site, or the min cDNA placed under the control of UAS sequences (Gal4 binding sites), which both allow a strong *m* ectopic expression upon crossing with Gal4 drivers (unpublished data). None of the drivers we tested led to cuticular defects. For example, overexpression of *m* with the *ptc-gal4* driver, both in denticle rows 2 and 3 and in a two-cell-wide stripe in naked cells (see Figure 1), does not affect cuticle organization (Figure 3A). Therefore, *m* expression is required, but not sufficient, for the correct formation of denticles.

These results show that *m* is directly involved in a specific aspect of denticle formation. All together, these data further

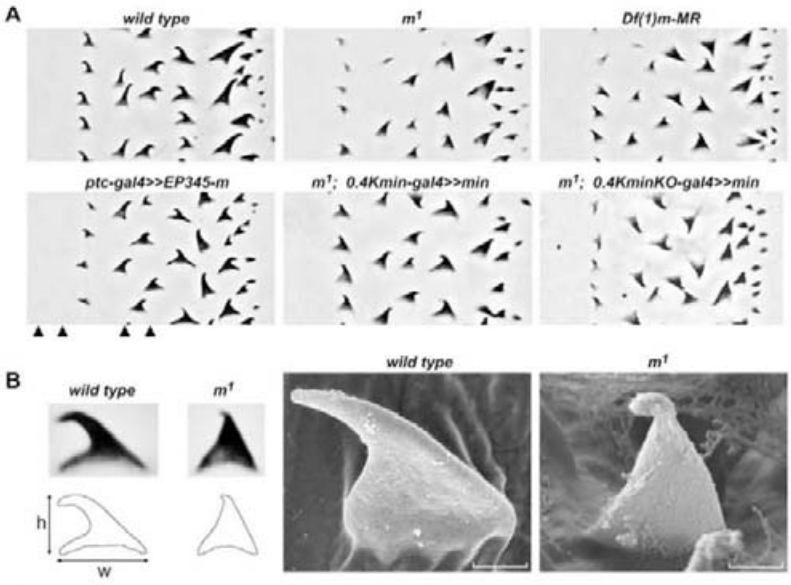


Figure 3. *m* Impinges on Denticle Formation

(A) Consequences of alterations of *m* function and expression on denticle formation. The m^1 mutation leads to morphological alteration of denticles, with a characteristic abnormal triangular shape. A similar phenotype is observed with *Df(1)m-MR*, a deficiency in which the entire *m* locus is deleted. Overexpression of *m*, by crossing the Ptc-Gal4 driver line to EP345-m, does not modify the cuticular phenotype in the corresponding regions (arrowheads). Re-expression of wild-type *m* products driven by the 0.4Kmin-gal4 transgenic lines, but not 0.4KminKO-Gal4 lines, rescues the characteristic denticles defects of m^1 embryos. All pictures correspond to the A4 segment.

(B) High magnification views of wild-type *(wt)* and m^1 denticles (fourth rows of A4), as observed in either light (left) or scanning electron microscopy (right). Whereas the absence of *m* does not affect the denticle height (h), the width (w) is reduced, producing denticles of smaller area that display an abnormal shape lacking the median constriction characteristic of wild-type denticles. See Table S2 for quantification of these defects.

DOI: 10.1371/journal.pbio.0040290.g003

demonstrate that *svb* directly impinges on epidermal cell morphogenesis through the direct control of *m* transcription.

Mutations Altering Denticles Allow the Identification of Additional *svb* Targets

The inactivation of *m* is not sufficient to mimic the *svb* phenotype, indicating that *svb* must regulate additional targets to achieve denticle formation. Mutations known so far to prevent denticle formation affect either *svb* or upstream regulators, therefore suggesting that inactivation of a given *svb* downstream target produces denticle malformation rather than prevents denticle formation. To test this hypothesis, we searched extensively for genes affecting denticle morphology (Table S1) and examined whether they are regulated by *svb*.

A dozen genes reported to affect denticle formation lead, when inactivated, to general cuticle defects, which are not, however, specific to trichomes (Table S1 and references therein). These genes (e.g., the Halloween family that encodes members of the ecdysteroid pathway) are either not expressed in the epidermis (e.g., are restricted to the ring gland) or display ubiquitous expression in epidermal cells (Table S1 and references therein).

Mutations corresponding to seven genes affect denticles, without altering either the general cuticle organization or embryonic patterning (Table S1). While the expression of *fritz, hem, tricornered,* and *Stubble* are ubiquitous or undetectable in the embryonic epidermis, *forked (f), singed (sn),* and *shavenoid/kojak (sha)* display a segmental pattern of expression (Table S1). Mutations in both *sn* and *f* lead to similar defects [22], with thin, crooked abnormal denticles, whereas *sha* mutants display a distinct phenotype [25,32] with small, misshapen, multiply split denticles (Figure 4A and Table S2). Detailed analysis of mRNA distribution revealed that *sn, f,* and *sha* are specifically expressed in denticle cells (Figure 4B). The epidermal expression of their transcript is strongly reduced in *svb* mutants (Figure 4B), revealing that *svb* is necessary for *sn, f,* and *sha* expression in denticle cells. In addition, *svb* is sufficient to promote *sn* and *sha* expression in the epidermis, since their mRNA is robustly expressed in additional stripes following ectopic expression of *svb* (Figure 4B). The *svb*-driven ectopic expression of *f* is barely detectable, indicating that additional factors are required to promote *f* expression in naked cells. Taken together, these data show that the transcription of genes previously implicated in denticle formation is specifically activated by *svb*.

sn, f, and *sha* encode actin-associated factors [32,33], and a recent study has shown that other components of the actin cytoskeleton (Diaphanous, Enabled, and the members of Arp2/3 complex) accumulate in forming denticles [23]. This prompted us to analyze the embryonic expression of these genes, as well as additional actors in actin remodeling *(chickadee, gelsolin,* and *twinstar).* All exhibit ubiquitous expression in embryos, which is not influenced by *svb* activity

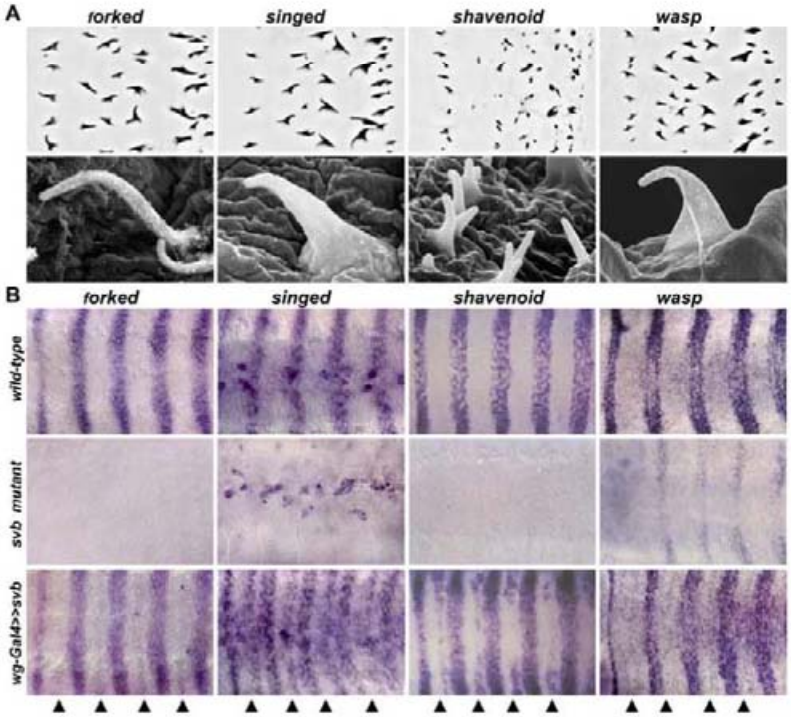


Figure 4. *svb* Directs the Expression of Genes Encoding Actin-Remodeling Proteins Required for Denticle Formation

(A) Cuticle preparations showing denticle morphology in f^{36a} sn^{3} sha^{1} and wsp^{3} mutants. All views correspond to the same region, i.e., the ventral-most region of the A4 segment. Close-ups are scanning electron microscopy magnification of a representative denticle from the fourth row of denticles.

(B) mRNA expression of *forked, singed, shavenoid/kojak,* and *wasp* in the ventral embryonic abdomen (A2–A6) of wild-type, *svb* mutants, and embryos expressing *svb* in *wg* cells, as observed from in situ hybridization. Arrowheads point to *wg* cells. Anterior is to the left in all pictures.

DOI: 10.1371/journal.pbio.0040290.g004

(Table S1). However, we found that *wasp (wsp)*, which encodes an activator of the Arp2/3 actin nucleation complex [34], is specifically expressed in denticle cells, in a *svb*-dependent manner (Figure 4B). The epidermal expression of *wsp* is strongly reduced in *svb* mutants and ectopic expression of *svb* leads to additional bands of *wsp* mRNA in naked cells, albeit at a much weaker level than in denticle cells (Figure 4B). Cuticle analysis revealed that zygotic *wsp* mutations [35] lead to the alteration of denticles, which are abnormally thin and often display bent extremities (Figure 4A). These defects are likely due to the lack of activation of the Arp2/3 complex, since the zygotic inactivation of two ubiquitous Arp2/3 subunits (ArcP34 and ArcP41) causes denticle alterations similar to those observed in *wsp* mutants (unpublished data).

Consistent with the idea that actin reorganization is required for denticle formation, our results show that Svb activates the expression of a subset of genes controlling actin dynamics, whose individual inactivation produces defects in denticle morphology.

svb-Regulated Genes Functionally Collaborate in Denticle Formation

Inactivation of each *svb* target we identified leads to specific defects in the morphology of denticles, but is not sufficient to inhibit their formation. This suggests either that these genes are involved in nonessential aspects of denticle formation (e.g., fine shaping) or, alternatively, that denticle formation relies on the collective activity of numerous effectors, none of them being absolutely indispensable. To discriminate between these possibilities, we analyzed embryos carrying combinations of mutations in different *svb* targets.

The phenotype of *sn, f* double mutants is slightly aggravated when compared to that of *sn* or *f* mutants (Table S2). When *m* mutation is combined with either *sn* or *f*, denticles display both the crooked extremities found in *sn* and *f*, and the defects characteristic of *m*. In addition, the inactivation of *m* and *f* (or *sn*) causes denticle splitting, as revealed by a significant increase in the number of abnormal denticles per row (Table S2). Simultaneous inactivation of all three genes leads to small and highly misshapen denticles that are more affected than in double mutants (Figure 5A and Table S2). Adding a fourth mutation, *wsp* or *sha*, further impairs the formation of denticles, leading in many cases to their replacement by naked regions (Figure 5A). The cumulated inactivation of *svb* targets thus progressively leads to tiny and highly malformed denticles, ending in the inhibition of denticle formation (Figure 5A). A similar effect is observed in the dorsal region, where combining mutations in *svb* targets ultimately prevents dorsal hair formation, in addition to producing cumulative morphological defects (Figure 5B). These results demonstrate that the morphological differentiation of the embryonic epidermis requires the concerted action of multiple genes, all playing a direct role in the formation both of denticles and dorsal hairs.

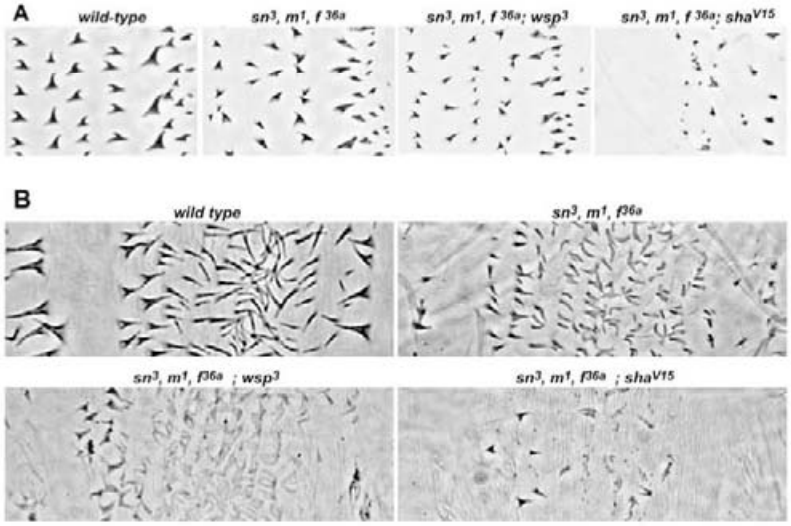


Figure 5. *svb* Downstream Targets Act Collectively in the Formation of Both Denticle and Dorsal Hairs

(A) Denticle defects resulting from the combinations of individual mutations of sn^3, f^{36a}, m^1, sha^1, and wsp^3 (views of the ventral region of the A4 segment). Embryos triple mutant for *m, sn,* and *f* display an aggravated phenotype with respect to each simple mutant or double mutant. This leads to poorly differentiated denticles, which display an extremely thin tip and a small triangular base. In addition, the lateral spacing of mutant denticles is reduced, a consequence of denticle splitting with two tiny extensions side by side. The combined inactivation of *sn, f, m,* and *wsp* further increases the severity of mutant phenotypes, producing very small and highly abnormal denticles. Similarly, in embryos simultaneously lacking *sn, f, m,* and *sha,* the few remaining extensions are atrophic, and numerous denticles are replaced by naked cuticle.

(B) *svb* downstream targets are required for dorsal hair formation. The dorsal region of a wild-type abdominal segment displays a stereotyped arrangement of epidermal extensions presenting a specific morphology: a row of large trichomes pointing anteriorly, a stripe of naked cuticle, three rows of extensions of intermediate size, and several rows of thin hairs. The cumulated inactivation of *svb* targets profoundly impairs dorsal hair formation. Hairs that display the superimposition of single mutant phenotypes are thickened *(m),* crooked *(sn, f)* and split *(f, wsp, sha)*. In sn^3, f^{36a}, m^1 triple mutants, dorsal hairs are severely reduced in size and, in several cases, the formation of dorsal hair is abrogated, leaving abnormal naked regions, as best seen in the first row of trichomes. These phenotypes are even more pronounced following the combination with *wsp* mutation, and culminate in embryos lacking *m, sn, f,* and *sha,* where most dorsal hairs are absent and replaced by naked cuticle. In some cases, atrophic dorsal hairs are seen as duplicated spots, revealing hair splitting as observed in *sha* and *f* embryos. All pictures correspond to the A4 segment.

DOI: 10.1371/journal.pbio.0040290.g005

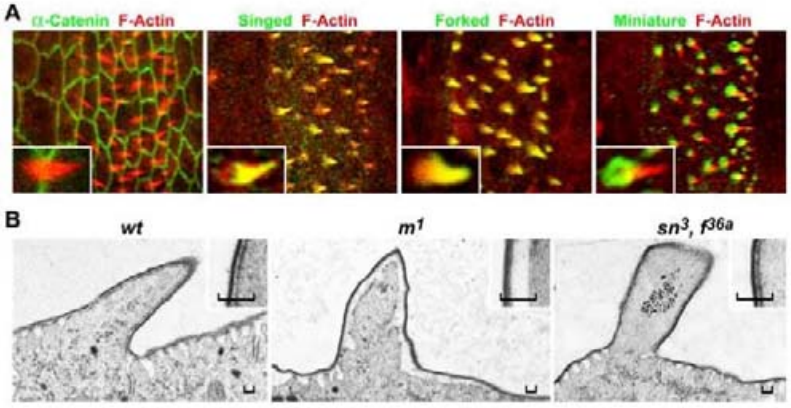


Figure 6. *svb* Target Genes Are Involved in Separate Features of Denticle Edification

(A) Subcellular localization of Singed, Forked, and Miniature in the epidermis of stage 15 wild-type embryos. Distribution of α-catenin, a component of adherens junctions that underlines the cell contour, was observed in embryos expressing α-catenin-GFP driven by E22C-Gal4. Red indicates F-actin, and green indicates α-catenin, Singed, Forked, and Miniature.

(B) Transmission electron microscopy analysis of denticle cells from wild-type *(wt)*, m^1, and sn^3, f^{36a} double mutant embryos. As in smooth cells, the flat region of the apical cell face organizes microvilli that contact cuticle layers only at the apex. In contrast, the plasma membrane is in close contact with cuticle along the entire wild-type denticle contour. Although the m^1 mutation alters this membrane/cuticle contact, no defects are visible in sn^1, f^{36a} embryos. Close-up pictures show a region of the growing extension. Scale bar represents 0.25 μm.

DOI: 10.1371/journal.pbio.0040290.g006

To better understand the role of *svb* targets, we analyzed the subcellular distribution of Singed, Forked, and Miniature proteins at the onset of denticle formation. Forked, Singed, and Miniature are sequentially accumulated in denticle cells (Figure S1) and, consistent with their bundling activity, both Singed and Forked co-localize with F-actin in growing denticles (Figure 6A). Forked accumulates in nascent denticles, from the earliest steps of F-actin reorganization, whereas Singed appears slightly later, when the apical bundle is already formed and is continuing to grow. Miniature appears concomitantly with Singed and is initially detected in the cytoplasm of denticle cells (Figure S1). In later embryos (stage 15 and 16), Miniature accumulates in a restricted apical domain that underlines the base of each denticle (Figure 6A). Since Miniature is a membrane protein, this observation suggests the existence of a denticle-specific membrane subdomain. We therefore analyzed mutant defects at the ultrastructural level. In stage 16 wild-type embryos, the apical surface of epidermal cells organizes a dense array of microvilli that contact the cuticle only at their distal tips (Figure 6B). In contrast, there is a continuous and tight interaction between plasma membrane and cuticle layers in the denticle region (Figure 6B). Although naked cells are unaffected, denticle cells do not contact cuticle correctly in *m* mutant embryos (Figure 6B). The apical membrane is disorganized, with an abnormal gap between the denticle membrane and cuticle layers, indicating that *m* is required for the membrane/cuticle interaction that is specific to denticle cells. These defects are not observed in *sn*, *f* mutants (Figure 6B), confirming that they are specific to the lack of *m* activity.

Therefore, these data reveal that denticle formation requires, besides actin remodeling, a specific modification of the membrane/cuticle interaction that is directly dependent on the localized activity of Miniature. All together, these results show that *svb* directs the expression of cellular effectors involved in different steps and aspects of cell shape control, which are collectively responsible for denticle formation.

svb Controls Denticle Pigmentation in the Embryonic Epidermis through the Regulation of *yellow* Transcription

In addition to the reorganization of cell shape, denticle formation implies pigmentation of cuticle extensions. We noticed that the supernumerary cuticular extensions formed after ectopic expression of *svb* are as darkly pigmented as normal denticles (Figure 7A), thus suggesting that *svb* also controls the expression of pigmentation genes in the ventral epidermis.

Cuticle pigmentation results from the activity of the catecholamine biosynthetic pathway, which transforms tyrosine into DOPA derivatives that are responsible for both sclerotization and coloration of the cuticle (reviewed in [24]). We examined the embryonic expression of ten genes putatively involved in pigmentation [24]; among them, four are expressed in the epidermis: *pale (ple)*, *dopadecarboxylase (Ddc)*, *alpha-methotrexate deficient (amd)*, and *yellow (y)* (Figure 7B). While the expression of *ple*, *Ddc*, and *amd* are unaffected in *svb* mutants, we found that *y* is regulated by *svb*. Although *y* expression is strongly up-regulated in a subset of denticle cells in late wild-type embryos , this expression is undetectable in *svb* mutants (Figure 7C). Furthermore, ectopic expression of *svb* turns on *y* transcription in additional cell stripes (Figure 7C), showing that *svb* regulates *y* expression in epidermal cells.

Therefore, in addition to cytoskeletal organization, *svb* also controls cuticle pigmentation through the up-regulation of *y* expression in denticle cells.

Discussion

Using denticle pattern as a readout of developmental cues, generations of fly geneticists have collectively gained a rare insight into the mechanisms acting to specify different cell populations. Quite paradoxically, how this pattern information is connected to cell shape remodeling for denticle formation has so far remained an unsolved question.

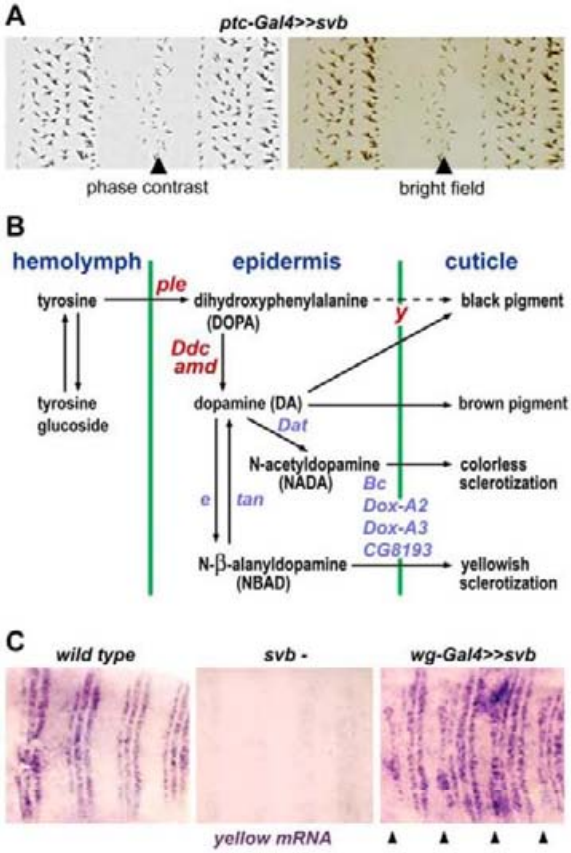


Figure 7. *svb* Controls Denticle Pigmentation through the Regulation of *y* Transcription

(A) Cuticle preparations (A3–A4 segments) showing the effect of Ptc-Gal4–driven ectopic expression of *svb*. Ectopic cuticular extensions (arrowheads) are as densely pigmented as normal denticles, as demonstrated by bright-field observation (right).

(B) Summary of the cuticular pigmentation pathway, showing genes that are putatively implicated in the transformation of tyrosine to pigmented compounds. Of the ten genes thought to be involved in pigment production we tested, only four (red) are expressed in the embryonic epidermis at the time of cuticle formation.

(C) In situ hybridization showing the expression of *y* mRNA in the epidermis in late embryos. In wild type, *y* mRNA accumulates in three stripes per segment. Due to deep morphological folds at this stage, it is hard to define accurately the number of cell rows that express *y* in each segment. *y* transcription is controlled by *svb*, since staining is strongly decreased in *svb* mutant and an ectopic stripe of *y* mRNA (arrowheads) results from *svb* ectopic expression in *wg* cells.

DOI: 10.1371/journal.pbio.0040290.g007

We show here that a single regulator, Shavenbaby, previously shown to integrate multiple patterning cascades, governs epidermal cell remodeling through the transcriptional control of several classes of effectors, acting directly in various cellular functions. This *svb*-regulated set of effectors constitutes a developmental module used in different tissues during development to produce cuticle extensions. Modification of *svb* expression has allowed the concerted evolution of this developmental module to produce morphological diversification during the evolution of insect species.

svb Controls Several Aspects of Actin Organization

One of the first recognizable signs of the morphological differentiation of epidermal cells is the formation of an apical bundle of microfilaments in denticle cells [22,23]. These early steps of denticle formation depend on *svb*, which is necessary and sufficient to promote the formation of epidermal actin bundles [14]. Our results show that *svb* controls the transcription of several genes involved in different steps of actin assembly/organization. First, we found that *svb* directs the expression of *shavenoid/kojak*, a gene producing strong denticle defects when mutated and recently shown to encode a protein reported to associate with actin [32], but whose biochemical function is unknown. Second, Svb also directs the expression of *singed* and *forked*, coding respectively for the *Drosophila* putative homologs of Fascin and Espin, two proteins that crosslink parallel actin filaments and promote the formation of bundles of microfilaments [36,37]. The Forked and Singed proteins sequentially accumulate in growing denticles, a situation reminiscent of that of wing hair formation [38], suggesting that these proteins play similar roles in the formation of adult and embryonic epidermal extensions. Accordingly, the inactivation of *sn* and *f* alters denticles, strongly suggesting that denticle formation indeed involves parallel actin bundles, as shown for wing hairs.

Several cytoskeletal regulators such as dAPC, Enabled, Diaphanous/Formin, and the Arp2/3 complex, accumulate in denticles [14,23], suggesting that they are involved in denticle formation, although their respective functions remains to be evaluated. Whereas *svb* does not control the expression of those ubiquitous actin-associated factors, it is possible that *svb* regulates their activity, or subcellular localization, indirectly. Consistent with this hypothesis, we have previously shown that dAPC-2 is specifically relocalized in *svb*-induced ectopic epidermal extensions [14]. In addition, we show here that *svb* directs the epidermal expression of Wasp, a key activator of the Arp2/3 actin nucleator complex, which is well known to trigger the formation/elongation of actin filaments. Moreover, it has been shown in vitro that Fascin switches the activity of the Arp2/3 complex from the formation of a mesh-like branched network to parallel microfilaments [39], therefore suggesting that *svb* targets can regulate both the formation of actin filaments and their reorganization, at least in part, through a tight control of the activity of the Arp2/3 complex during denticle formation.

Taken together, these results show that *svb* controls the expression of several cytoskeletal factors which, probably by modifying the activity of housekeeping actin-remodeling machinery, act together to trigger the formation of apical cell extensions. Whereas few molecules are sufficient to promote actin organization in vitro, our studies indicate that, in vivo, many players are required to make a simple cellular extension. Pursuing the identification of novel genes regulated by *svb* should provide a means of identifying additional factors required for actin remodeling in vivo.

Denticle Formation Requires a Specific Membrane/Cuticle Interaction

A surprising outcome of our studies is that denticle formation requires a specific regulation of the membrane/cuticle interaction. We show that *svb* directs the expression of *m* in trichome cells. Miniature is a single-pass membrane

protein, with a short cytoplasmic tail and a large extracellular region that contains a conserved Zona Pellucida (ZP) domain [28]. ZP domains were initially identified in the three major proteins of the zona pellucida, the extracellular envelope of mammalian oocytes (see [30] for a recent review), and they are thought to be components of apical matrices [40]. We show that Miniature is required for the correct formation of denticles, revealing a novel aspect of ZP protein function in the formation of polarized cellular extensions. The absence of *m* severely impairs the interaction between the plasma membrane and cuticle layers in denticle cells, a defect likely due to a disorganization of the extracellular matrix. In the embryonic epidermis, Miniature is required for the continuous membrane/cuticle interaction that is specific to denticles, whereas only the tips of microvilli contact cuticle in naked regions [5]. The accumulation of Miniature at the base of denticles reveals the existence of a denticle-specific membrane subdomain, suggesting that additional membrane proteins might be involved in denticle formation. We found that two other ZP genes are regulated by *svb* (Table S1) and analysis of their individual role in denticle formation is under way. Our findings shed light on the importance of membrane proteins and their interaction with extracellular matrices, an aspect of cell-shape control hardly accessible to cell-culture approaches. Future analysis of Miniature targeting to the denticle should help to understand the mechanisms required for localized cell-shape modification during morphogenesis.

svb also regulates the expression of *y*, a gene encoding an apically secreted protein that associates with cuticle and is required for the production of black pigments [24]. While pigmentation per se is not related to cell morphogenesis, the role of Yellow in the catecholamine pathway remains elusive; it could be involved in denticle hardening, since *y* mutant larvae display defects, in the morphology of denticles, that have been proposed to account for their abnormal locomotor activity [41]. In addition, *svb* could directly regulate the local protein composition of cuticle, as suggested by the identification of an additional target encoding a putative chitin-binding protein (Table S1).

Svb Governs a Morphological Module

Experimental evidence suggests that *svb* is situated at the bottom of regulatory cascades determining trichome patterning and is in turn directly responsible for triggering the cellular program of denticle formation (Figure 8). First, *svb* remains the most-downstream regulator determining the pattern of denticles and dorsal hairs, despite the unprecedented extent of genetic screens based upon cuticle observation (which identified most members of the Wg and DER pathways). Second, among mutations producing trichome defects, *svb* mutants display the strongest phenotype, in which most denticles and dorsal hairs are replaced by naked cuticle. Third, we show that *svb* directs the expression of genes involved in various aspects of denticle formation, including control of the cytoskeleton, membrane/matrix organization and cuticle differentiation. Finally, we provide evidence for a direct control of one of the targets *(m)*. We have defined a 400-bp *m* enhancer reproducing the endogenous expression pattern of *m* in the epidermis and show that the Svb transcription factor binds specifically to this evolutionarily conserved region. Substituting 2-bp in this *cis*-regulatory element preventing Svb binding is sufficient to abrogate its in vivo enhancer ability, thus suggesting that direct binding of Svb mediates the control of *m* epidermal expression. Several putative *svb* binding sites have been detected in evolutionarily conserved regions of other *svb* targets. Whether they are all required for *svb* transcriptional regulation remains to be tested. Further dissection of the *m* enhancer, as well as those of other *svb* targets, should lead to the definition of a functional *cis*-regulatory element responsible for *svb* control. This outcome should facilitate the identification by bioinformatic approaches of additional *svb* responsive enhancers and target genes.

We propose that *svb* directly controls the expression of a set of "effector" genes, all required for a concerted modification of cell shape and cuticle organization to achieve the formation of denticles (Figure 8). How many genes are

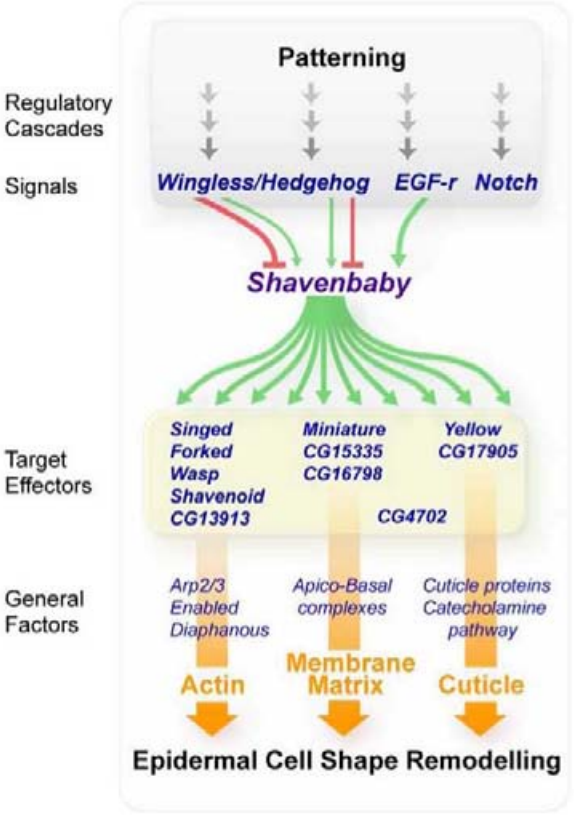


Figure 8. Model of *svb* Regulation and Activity during Denticle Formation

During epidermal differentiation, regulatory regions governing *svb* transcription integrate outputs from many signaling pathways (Wg, Hh, and DER) and positional cues to define the precise subset of epidermal cells that express *svb*. The Shavenbaby transcription factor triggers in turn the expression of different classes of genes encoding cellular effectors. They are directly involved in distinct aspects of trichome formation, including the reorganization of actin *(singed, forked, wasp,* and *shavenoid)*, extracellular matrix *(m)* and cuticle *(y)*, likely through modifying the activity of ubiquitous cellular machineries. Additional cytoskeletal factors or regulators (independent of *svb*) might be required for the fine sculpturing of each kind of trichome, characteristic of a given body region. Modifications of *svb cis*-regulatory regions thus provide a rich source of plasticity to evolve the trichome pattern and generate morphological diversification throughout species.

DOI: 10.1371/journal.pbio.0040290.g008

regulated by *svb* to promote remodeling of epidermal cells? Our analysis, which covers approximately 25% of the total number of *Drosophila* genes, has led to the identification of 11 downstream targets, suggesting that *svb* activates the expression of numerous additional genes to trigger the formation of embryonic epidermal cell extensions.

Several results suggest that this *svb*-controlled module is used in different developmental programs that produce cuticle extensions. Although signaling pathways act differently in ventral and dorsal embryonic regions, we show that *svb* is also required to express the same target genes for the formation of denticles and dorsal hairs. These results show that the *svb* targets identified so far act collectively to promote the formation of various epidermal extensions, despite the fact that they display different shapes. In addition, *svb* mutations also affect the formation of adult wing hairs and antennae laterals [14], which are known to require the activity of several *svb* targets identified in the embryonic epidermis (*m, sn, f, sha* for adult wing hairs, and *sn, f, sha* for antennae laterals). How can the same set of *svb*-regulated effectors participate in the formation of epidermal extensions of diversified morphology? Additional cytoskeletal factors can be differentially expressed in distinct epidermal regions independently of *svb*. It is also possible that other regulators modulate the response to *svb* (cf. the weak expression of *f* and *wsp* in naked cells expressing ectopically *svb*, when compared to that of *sn, m, sha* and *y*). Finally, upstream signaling pathways certainly contribute to the sculpting of each kind of trichome through the regulation of the expression and/or activities of cellular effectors. Recent studies have shown that members of the planar polarity pathway (PCP) are indeed involved in defining denticle polarity in response to signaling pathways [23]. Interestingly, one of the identified *svb* targets, *shavenoid*, has recently been reported to interact with PCP in the adult wing, raising the possibility that such a dialog also occurs during embryonic epidermal cell remodeling. *svb* thus appears to govern a morphological module responsible for the major switch from smooth surface to trichome, the precise shape of which is finely sculptured by independent intrinsic factors and activities.

Evolutionary Perspectives

The pattern of trichomes has been modified several times during the evolution of insects. Across the genus *Drosophila*, at least four independent evolutionary transitions have led to the loss (to various extents) of dorsal hairs. Nevertheless, evolution of the pattern of dorsal hairs and denticles results from the modification of *svb* expression in all studied cases [17–19]. Although the expression of patterning genes is unchanged in all species examined [42], the difference in the dorsal hair pattern between *D. melanogaster* and *D. sechellia* is due only to the modification of *shavenbaby*'s response to signaling pathways [16]. Our analysis further shows that the restriction of *svb* expression in *D. sechellia* embryos causes, in turn, the restriction of the dorsal expression of *m, sn, f, sha,* and *wsp* genes (Figure S2). Therefore, all these *svb* targets display a concerted modification of their expression in *D. sechellia*, bringing additional evidence that together they constitute a developmental module. Consistent with this interpretation, we show that individual inactivation, or experimental modifications of the expression, of any of the *svb* target genes identified so far are not sufficient to modify the trichome pattern. These data indicate that denticle formation requires multiple factors that act collectively to remodel epidermal cell shape. This requirement for many genes to build a cuticular extension doubtless constitutes a developmental constraint, explaining why modifications of the expression of *svb*, the factor that governs this entire set of genes, are required for the trichome pattern to evolve.

Evolutionary modifications of *cis*-regulatory elements of *lin-48*, the putative *svb* homolog in worms, were responsible for the difference in the position of the excretory duct between *Caenorhabditis elegans* and *C. briggsae* [43]. Although accumulated data thus demonstrate the particular role of *svb* genes in morphological diversification between relatively close species, how they are related to the evolution of animal forms across more distant phyla remains an open question. Several features of *svb* function have been conserved in mammals, including the role of one of its homologs, *m-ovo1*, in the differentiation of epidermal derivatives [44] and its regulation by the Wnt pathway [45]. Our identification of genes regulated by *svb* in flies now opens the way to evaluate the contribution of the different parameters contributing to the role of *svb* in morphological evolution, from the modification of its response to signaling pathways to that of its cellular targets.

Materials and Methods

Fly strains and transgenic constructs. We used *UAS-svb; UAS-ovoA; Ptc-Gal4; Wg-Gal4; svb*^{1}*; btd*^{1}*, svb*^{1}*; svbR9; w,m*^{1}*; sn*^{3}*; f*^{2}*; f*^{5}*; f*^{36a}*; sha*^{1}*; sha*^{V15}*; sn*^{3}*,f*^{36a}*; m*^{1}*,f*^{36a}*; m*^{1}*,sn*^{3}*; m*^{1}*,sn*^{3}*, f*^{36a}*; wsp*^{1}*; wsp*^{3}*; m*^{1}*,sn*^{3}*, f*^{36a}*; m*^{1}*,sn*^{3}*, f*^{36a}*,sha*^{1}*; m*^{1}*,sn*^{3}*,f*^{36a}*,sha*^{V15}*; m*^{1}*,sn*^{3}*, f*^{36a}*,wsp*^{3}*;* w, Df(1)m-MR; P(EP)EP345, and a *w D. sechellia* stock from the D. Stern Laboratory. Stocks with multiple mutations were obtained by recombination, and mutant chromosomes were kept over balancers carrying Kr-Gal4>>UAS-GFP transgenes [46]. Transgenic lines were generated using standard P-element transformation. Based on the 2003 genome release, the 6kmin construct corresponds to genomic position chrX:11585555–11591094 and 11596605–11597139, 3kmin to chrX:11585555–11588410; positions, both inserted into pCasPER β-gal. Wild-type, or site-directed mutagenized, 0.4Kmin enhancer was amplified from genomic regions (11487355–11487753) and cloned into the pCβ vector (carrying a nuclear-LacZ reporter) and in the pGal4 vector for rescue experiments. A full-length *m* cDNA inserted into the pUASt vector was used to generate pUAS-min transgenic lines. Details of cloning strategy are available upon request.

Embryo staining. Antisense probes derived from cDNAs or genomic fragments were synthesized in vitro and processed for in situ hybridization following standard procedures. To identify *svb* mutant embryos, we used either a *svb* mutant chromosome carrying the *btd1* mutation (leading to head defects; a gift from E. Wieschaus), or embryos sorted using the GFP balancer. For high-resolution imaging, ventral epidermis was hand-dissected. Immunostaining was performed according to [14], with anti-Miniature [28] at 1/400, anti-Forked [37] at 1/300, anti-Singed (Development Studies Hybridoma Bank, Iowa City, Iowa, United States) at 1/2, anti β-galactosidase (Cappel, Solon, Ohio, United States), Alexafluor488-labeled antibodies (Molecular Probes, Eugene, Oregon, United States) and TRITC-phalloidin (Sigma, St. Louis, Missouri, United States). Embryos were mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, California, United States) and photographed with a Leica TSP2 confocal microscope (Wetzlar, Germany).

Cuticle preparation and electronic microscopy. Live mutant embryos (lacking GFP fluorescence from balancers) were hand-selected and cuticles prepared in hoyers/lactic acid (1/1). Abdominal segments 3 and 4 were imaged using a Zeiss Axioplan microscope equipped with phase contrast (Zeiss, Oberkochen, Germany). All high-magnification pictures correspond to the midline region of the fourth abdominal segment. For scanning electron microscopy, stage 16 embryos were fixed 15 min in heptane saturated in glutaraldehyde, devitellinized by hand and, after several water washes, dehydrated through an ethanol series. They were then dried using CO_2 in a BOMAR SPC-900/EX critical-point dryer (Bomar, Tacoma, Washington, United States), sputtered (MED 020, Bal-Tek, Balzers,

Liechtenstein) with a 20-nm gold palladium coat and examined with a Philips XL30 field emission microscope. For transmission electron microscopy, stage 16 embryos, fixed and devitellinized as above, were post-fixed for 1 h in para-formaldehyde 3%, glutaraldehyde 0.5% in PBS and then in 1% osmium-tetroxide for 1h. After dehydration, samples were embedded in Epon. Sections were stained with uranyl acetate and photographed with a Leo 510 (Zeiss) microscope.

Electrophoretic mobility shift assay and in vitro DNA-binding. DNA binding assays were performed as previously described [29]. Wild-type or site-directed mutagenized *m* DNA probes (position 11487606–11487768) were synthesized by PCR, end-labeled and incubated with recombinant proteins, produced in bacteria, and purified according to the manufacturer's specifications (Pharmacia, Uppsala, Sweden). We used GST-SVB, a fusion protein with the 450 C-terminal aa of Svb encompassing the DNA binding domain, and GST alone as control. Electrophoresis gels were analyzed using a Bio imaging analyzer (Fuji, Tokyo, Japan).

Supporting Information

Figure S1. Time-Course Analysis of the Distribution of Forked, Singed, and Miniature Proteins during Remodeling of Ventral Epidermal Cells

Embryos were collected for 1 h at 18 °C, then allowed to develop at 25 °C for a period corresponding to 11, 12, and 14 h, before being processed for actin and immunological staining. Confocal views of abdominal segments A3 and A4 were recorded using a Leica TSP 2 microscope.

Found at DOI: 10.1371/journal.pbio.0040290.sg001 (2.6 MB JPG).

Figure S2. Evolution of *svb* Target Gene Expression in *D. sechellia* Embryos

Epidermal expression of *wasp*, *forked*, *singed*, and *shavenoid* in stage 15 embryos from *D. melanogaster* (left) and *D. sechellia* (right) species. All pictures are lateral views, corresponding to the same abdominal segments. Anterior is to the left and dorsal is up.

Found at DOI: 10.1371/journal.pbio.0040290.sg002 (513 KB JPG).

Table S1. Summary of Candidate Genes Tested for Their Putative Regulation by the Shavenbaby Transcription Factor

Candidates were selected by three independent criteria. (1) Expression pattern: we searched for genes transcribed in a subset of epidermal cells, by conducting a survey of the project of systematic determination of patterns of gene expression in *Drosophila* embryogenesis that runs in the Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP; http://toy.lbl.gov:8888/cgi-bin/ex/insitu.pl), and from published literature. (2) Denticle phenotype: we selected genes reported to specifically affect denticle formation when mutated. (3) Putative function: we selected candidates known to be involved in a biological process that is implicated in denticle formation, either actin remodeling, cuticle pigmentation, or cuticle formation.
We confirmed or established the expression pattern of candidates by in situ hybridization, and determined whether their expression depended upon *svb* activity by comparing their expression between wild-type and *svb* mutant embryos. Each candidate showing a strong reduction of its epidermal expression in *svb* mutants was further validated through the analysis of consequences both of *svb* ectopic expression *(ag≫svb)* and of the inhibition of *svb* activity in a subset of denticle cells *(ptc≫OvoA)*. The different columns refer to the name of candidates, their synonym, their respective Flybase identifier (http://flybase.bio.indiana.edu/), their putative function, a summary of their embryonic expression at the time of epidermal differentiation and their dependence on *svb* activity.

CNS, central nervous system; Ep, epidermal; NT, not tested.

Found at DOI: 10.1371/journal.pbio.0040290.st001 (35 KB PDF).

Table S2. Quantification of Denticle Defects Resulting from Inactivation of *svb* Downstream Targets

The denticle belt of the fourth abdominal segment of wild-type and simple or multiple mutant embryos was photographed at high resolution (using a 63× phase contrast objective, NA [numerical aperture] = 1.4, and a digital Nikon CCD camera). Pictures were processed and analyzed using the ImageJ software (http://rsb.info.nih.gov/ij). We focused on the fourth row of denticles, which are relatively large and display a characteristic stereotyped morphology. Analyses were performed on five to ten individuals of the same genotype, to obtain a number of denticles superior to 70.
(A) Summary of the consequences of *svb* target inactivation on denticle formation. We measured several geometrical parameters, including denticle area, perimeter, width, and height. We also determined the number of denticles that are present along the fourth row (*, we focused on a 75 μm-wide region, corresponding to the most ventral part). Statistical analyses (3 way ANOVA, with denticle being nested in individuals, which is nested in genotype on a given variable) confirm that despite intragroup variations, differences between genotypes can be considered as highly significant ($p < 0,001$). The only exception is between *m1* and *Df(1)mr*, which is not statistically different, in a good agreement with the fact the *m1* mutation is reported to be a null *m* allele.
(B) Histograms plot the respective effects of *svb* targets on denticle size (as estimated by the area) and number along the row. Inactivation of each individual target decreases denticle size to various extents, a phenotype aggravated when mutations are cumulated. The absence of *shavenoid* causes a severe reduction of the size resulting from multiple split denticles, as indicated by the increase of the apparent denticle number (and confirmed by scanning electron microscopy analyses). Combination of *m* and *sn* (and/or *f*) also leads to denticle splitting, albeit at a lesser extent. The simultaneous inactivation of *m*, *sn*, *f*, and *sha* results in a strong reduction of the number of denticles that are replaced by naked regions, indicating a functional interaction between these genes for denticle formation.

Found at DOI: 10.1371/journal.pbio.0040290.st002 (1.1 MB JPG).

Acknowledgments

We thank J. Smith, P. Blader, A. McGregor, D. Stern, I. Delon, L. Waltzer, and other members of our laboratory for discussions and critical reading of the manuscript. We are grateful to Y. Latapie and P. Valenti for their help during the latest stages of this work. We are grateful to G. Guild, D. Stern, E. Wieschaus, the Bloomington and National Institute of Genetics (NIG-Fly) fly stock centers, and Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) for providing us with fly stocks and antibodies. We very much thank M. Affolter, in whose laboratory part of this work was done, and Daniel Mathys and Ursula Sauder (Zentrum Mikroskopie der Universität Basel) for the skilful electron microscopy pictures.

Author contributions. HCD, FP, and SP conceived and designed the experiments. HCD, IF, FP, and SP performed the experiments. HCD, IF, FP, and SP analyzed the data. FR and FP contributed reagents/materials/analysis tools. HCD, FP, and SP wrote the paper.

Funding. This work was supported by grants from the Association pour la Recherche contre le Cancer (3832) and Fondation pour la Recherche Médicale (programme équipe 2005). HCD was supported by a fellowship from the Ligue Nationale Contre le Cancer.

Competing interests. The authors have declared that no competing interests exist.

References

1. Martinez Arias A (1993) Development and patterning of the larval epidermis of *Drosophila*. In: Bate M, Martinez Arias A, editors. The development of Drosophila melanogaster. Cold Spring Harbor (New York): Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 517–608.
2. Hatini V, DiNardo S (2001) Divide and conquer: Pattern formation in *Drosophila* embryonic epidermis. Trends Genet 17: 574–579.
3. Sanson B (2001) Generating patterns from fields of cells. Examples from *Drosophila* segmentation. EMBO Rep 2: 1083–1088.
4. Urban S, Brown G, Freeman M (2004) EGF receptor signalling protects smooth-cuticle cells from apoptosis during *Drosophila* ventral epidermis development. Development 131: 1835–1845.
5. Payre F (2004) Genetic control of epidermis differentiation in *Drosophila*. Int J Dev Biol 48: 207–215.
6. Noordermeer J, Johnston P, Rijsewijk F, Nusse R, Lawrence PA (1992) The consequences of ubiquitous expression of the wingless gene in the *Drosophila* embryo. Development 116: 711–719.
7. Szuts D, Freeman M, Bienz M (1997) Antagonism between EGFR and Wingless signalling in the larval cuticle of *Drosophila*. Development 124: 3209–3219.
8. Wiellette EL, McGinnis W (1999) Hox genes differentially regulate Serrate to generate segment-specific structures. Development 126: 1985–1995.
9. Alexandre C, Lecourtois M, Vincent J (1999) Wingless and Hedgehog pattern *Drosophila* denticle belts by regulating the production of short-range signals. Development 126: 5689–5698.
10. Walters JW, Munoz C, Paaby AB, Dinardo S (2005) Serrate-Notch signaling defines the scope of the initial denticle field by modulating EGFR activation. Dev Biol 286: 415–426.

11. Payre F, Vincent A, Carreno S (1999) ovo/svb integrates Wingless and DER pathways to control epidermis differentiation. Nature 400: 271–275.
12. Mevel-Ninio M, Terracol R, Salles C, Vincent A, Payre F (1995) ovo, a *Drosophila* gene required for ovarian development, is specifically expressed in the germline and shares most of its coding sequences with shavenbaby, a gene involved in embryo patterning. Mech Dev 49: 83–95.
13. Andrews J, Garcia-Estefania D, Delon I, Lu J, Mevel-Ninio M, et al. (2000) OVO transcription factors function antagonistically in the *Drosophila* female germline. Development 127: 881–892.
14. Delon I, Chanut-Delalande H, Payre F (2003) The Ovo/Shavenbaby transcription factor specifies actin remodelling during epidermal differentiation in *Drosophila*. Mech Dev 120: 747–758.
15. DiNardo S, Heemskerk J, Dougan S, O'Farrell PH (1994) The making of a maggot: Patterning the *Drosophila* embryonic epidermis. Curr Opin Genet Dev 4: 529–534.
16. Sucena E, Stern DL (2000) Divergence of larval morphology between *Drosophila sechellia* and its sibling species caused by cis-regulatory evolution of ovo/shaven-baby. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 4530–4534.
17. Sucena E, Delon I, Jones I, Payre F, Stern DL (2003) Regulatory evolution of shavenbaby/ovo underlies multiple cases of morphological parallelism. Nature 424: 935–938.
18. Khila A, El-Haidani A, Vincent A, Payre F, Ibn-Souda S (2003) The dual function of ovo/shavenbaby in germline and epidermis differentiation is conserved between *Drosophila melanogaster* and the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. Insect Biochem Mol Biol 33: 691–699.
19. Delon I, Payre F (2004) Evolution of larval morphology in flies: Get in shape with shavenbaby. Trends Genet 20: 305–313.
20. McCartney BM, Dierick HA, Kirkpatrick C, Moline MM, Baas A, et al. (1999) *Drosophila* APC2 is a cytoskeletally-associated protein that regulates wingless signaling in the embryonic epidermis. J Cell Biol 146: 1303–1318.
21. Townsley FM, Bienz M (2000) Actin-dependent membrane association of a *Drosophila* epithelial APC protein and its effect on junctional Armadillo. Curr Biol 10: 1339–1348.
22. Dickinson WJ, Thatcher JW (1997) Morphogenesis of denticles and hairs in *Drosophila* embryos: Involvement of actin-associated proteins that also affect adult structures. Cell Motil Cytoskeleton 38: 9–21.
23. Price MH, Roberts DM, McCartney BM, Jezuit E, Peifer M (2006) Cytoskeletal dynamics and cell signaling during planar polarity establishment in the *Drosophila* embryonic denticle. J Cell Sci 119: 403–415.
24. Wittkopp PJ, Carroll SB, Kopp A (2003) Evolution in black and white: Genetic control of pigment patterns in *Drosophila*. Trends Genet 19: 495–504.
25. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E, Kluding H (1984) Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. Roux Arch Dev Biol 193: 267–282.
26. Wieschaus E, Nusslein-Volhard C, Jurgens G (1984) Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. Roux Arch Dev Biol 193: 296–307.
27. Tomancak P, Beaton A, Weiszmann R, Kwan E, Shu S, et al. (2002) Systematic determination of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis. Genome Biol 3: RESEARCH0088.1–RESEARCH0088.14. doi: 10.1186/gb-2002-3-12-research0088
28. Roch F, Alonso CR, Akam M (2003) *Drosophila* miniature and dusky encode ZP proteins required for cytoskeletal reorganisation during wing morphogenesis. J Cell Sci 116: 1199–1207.
29. Lu J, Oliver B (2001) *Drosophila* OVO regulates ovarian tumor transcription by binding unusually near the transcription start site. Development 128: 1671–1686.
30. Jovine L, Darie CC, Litscher ES, Wassarman PM (2005) Zona pellucida domain proteins. Annu Rev Biochem 74: 83–114.
31. DiBartolomeis SM, Akten B, Genova G, Roberts MA, Jackson FR (2002) Molecular analysis of the *Drosophila* miniature-dusky (m-dy) gene complex: m-dy mRNAs encode transmembrane proteins with similarity to *C. elegans* cuticulin. Mol Genet Genomics 267: 564–576.
32. Ren N, He B, Stone D, Kirakodu S, Adler PN (2006) The shavenoid gene of *Drosophila* encodes a novel actin cytoskeleton interacting protein that promotes wing hair morphogenesis. Genetics 172: 1643–1653.
33. Tilney LG, Connelly PS, Vranich KA, Shaw MK, Guild GM (2000) Regulation of actin filament cross-linking and bundle shape in *Drosophila* bristles. J Cell Biol 148: 87–100.
34. Machesky LM, Insall RH (1998) Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. Curr Biol 8: 1347–1356.
35. Ben-Yaacov S, Le Borgne R, Abramson I, Schweisguth F, Schejter ED (2001) Wasp, the *Drosophila* Wiskott-Aldrich syndrome gene homologue, is required for cell fate decisions mediated by Notch signaling. J Cell Biol 152: 1–13.
36. Bartles JR, Zheng L, Li A, Wierda A, Chen B (1998) Small espin: A third actin-bundling protein and potential forked protein ortholog in brush border microvilli. J Cell Biol 143: 107–119.
37. Adams JC (2004) Roles of fascin in cell adhesion and motility. Curr Opin Cell Biol 16: 590–596.
38. Guild GM, Connelly PS, Ruggiero L, Vranich KA, Tilney LG (2005) Actin filament bundles in *Drosophila* wing hairs: Hairs and bristles use different strategies for assembly. Mol Biol Cell 16: 3620–3631.
39. Vignjevic D, Yarar D, Welch MD, Peloquin J, Svitkina T, et al. (2003) Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. J Cell Biol 160: 951–962.
40. Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher E, Wassarman PM (2002) The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. Nat Cell Biol 4: 457–461.
41. Inestrosa NC, Sunkel CE, Arriagada J, Garrido J, Godoy-Herrera R (1996) Abnormal development of the locomotor activity in yellow larvae of *Drosophila*: A cuticular defect? Genetica 97: 205–210.
42. Dickinson WJ, Tang Y, Schuske K, Akam M (1993) Conservation of molecular prepattern during the evolution of cuticle morphology in *Drosophila* larvae. Evolution 47: 1396–1406.
43. Wang X, Chamberlin HM (2002) Multiple regulatory changes contribute to the evolution of the *Caenorhabditis* lin-48 ovo gene. Genes Dev 16: 2345–2349.
44. Dai X, Schonbaum C, Degenstein L, Bai W, Mahowald A, et al. (1998) The ovo gene required for cuticle formation and oogenesis in flies is involved in hair formation and spermatogenesis in mice. Genes Dev 12: 3452–3463.
45. Li B, Mackay DR, Dai Q, Li TW, Nair M, et al. (2002) The LEF1/beta-catenin complex activates movo1, a mouse homolog of *Drosophila* ovo required for epidermal appendage differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 6064–6069.
46. Casso D, Ramirez-Weber F, Kornberg TB (2000) GFP-tagged balancer chromosomes for *Drosophila melanogaster*. Mech Dev 91: 451–454.

DISCUSSION

Nous montrons ici qu'un facteur de transcription unique, Shavenbaby, intègre des cascades de signalisation multiples pour diriger le remodelage des cellules épidermiques embryonnaires. En retour, Svb déclenche l'expression spécifique de plusieurs classes d'effecteurs cellulaires, qui agissent directement dans le remodelage des cellules de l'épiderme. La formation de la denticule nécessite en effet la régulation du cytosquelette d'actine pour former l'extension, le dépôt de la cuticule, la sclérotisation et pigmentation de cette dernière. Nous avons ici pu identifier des gènes cibles de *svb* dont les produits sont impliqués dans chacun de ces trois processus.

Trois gènes cibles codent des protéines qui interviennent directement dans la réorganisation du cytosquelette d'actine. Wasp (Wiskott-Aldrich syndrome protein) est un régulateur positif du complexe de nucléation Arp2/3, participant à l'allongement des microfilaments (Pollard and Borisy, 2003). Les protéines, Forked (F) et Singed (Sn), sont quant à elles impliquées dans l'assemblage des filaments d'actine, établissant des liens (cross-link) entre les microfilaments parallèles (Adams, 2004) Chacune de ces protéines est requise pour la morphogenèse des denticules. Les mutants *wasp*$^{-/-}$ montrent des denticules de taille réduite et plus fines alors que les mutants *sn* ou *f* montrent des extensions mal formées, courbées ou tordues. Chez l'adulte (soies sensorielles), *f* est requis pour l'initiation de la formation des faisceaux d'actine alors que *sn* est nécessaire pour le maintien de la morphologie des faisceaux en cours de développement (Wulfkuhle et al., 1998). Un des signes précurseurs de la différenciation des futures cellules à denticules est l'accumulation de filaments d'actine à leur face apicale (Guild et al., 2005; Price et al., 2006). Les protéines Sn et F s'accumulent séquentiellement dans les denticules croissantes, tout comme dans les trichomes de l'aile, suggérant que ces protéines jouent un rôle similaire dans la formation des extensions adultes et embryonnaires (Guild et al., 2005). L'inactivation des gènes *sn* et *f* conduit à des défauts de la forme des denticules, démontrant que l'assemblage des filaments d'actine est une étape primordiale de la morphogenèse épidermique. De plus, plusieurs autres régulateurs du cytosquelette, comme dAPC, Enabled, Diaphanous/Formin et le complexe Arp2/3, s'accumulent dans les denticules, suggérant qu'ils sont eux aussi impliqués dans cette formation (Price et al., 2006). Pourtant, Svb ne contrôle pas leur expression dans l'épiderme mais il est possible que Svb régule indirectement leur activité ou leur localisation subcellulaire. Nous avons montré précédemment que dAPC-2 est spécifiquement relocalisé

dans des extensions épidermiques induites par l'expression ectopique de Svb (Delon et al., 2003). Enfin, nous montrons que Svb dirige l'expression de *shavenoid/kojak*, un gène récemment identifié, dont le produit serait capable de s'associer avec l'actine mais dont la fonction biochimique reste à identifier (Ren et al., 2006). Toutefois, la localisation uniforme de cette protéine autour des denticules ne ressemble pas à celle des autres protéines liant l'actine, comme Sn ou F (données non publiées). Ces données suggèrent donc un rôle différent de Sha dans ce processus.

Svb contrôle donc l'expression de plusieurs facteurs essentiels au remodelage du réseau d'actine nécessaire pour déclencher la formation des extensions cellulaires apicales. La poursuite de l'identification des gènes régulés par *svb* devrait permettre de découvrir des facteurs supplémentaires nécessaires pour remodeler l'actine *in vivo*. La modification de l'expression de *svb* a permis l'évolution concertée de ce module contrôlant la morphogenèse des cellules épidermiques au cours du développement et la diversification morphologique pendant l'évolution d'espèces d'insectes.

Svb régule aussi l'expression du gène *yellow* (*y*), impliqué dans la pigmentation de la cuticule. La première mutation de *y* a été décrite en 1911 par E.Wallace. Puis, T.H Morgan, en 1916, a montré que ce gène est requis pour la production de pigments cuticulaires (figure 7 de l'article). Néanmoins, le rôle biochimique exact de Y dans la pigmentation reste encore à déterminer. Les pigments cuticulaires dérivent des catécholamines, qui sont synthétisés à partir de la tyrosine. La Tyrosine hydroxylase (TH) et la Dopa décarboxylase (DCC) convertissent la tyrosine en dihydroxyphénylalanine (DOPA) puis en dopamine (DA) dont l'oxydation en quinones produit des dérivés impliqués dans la rigidification et la pigmentation (Wittkopp et al., 2002). Chez l'adulte, la combinaison entre les pigments noirs et bruns contrôlés, respectivement par *y* et *ebony* (*e*), permet de définir les différentes pigmentations de la cuticule. La pigmentation semble *a priori* un processus différent de la morphogenèse cellulaire. Pourtant, en fin d'embryogénèse, les filaments d'actine sont désassemblés et l'architecture cuticulaire doit se maintenir et il faut pour cela rigidifier la cuticule. Les larves mutantes pour *y* montrent des défauts de la morphologie des denticules, générant une activité locomotrice anormale (Inestrosa et al., 1996). Svb pourrait directement réguler la composition locale en protéines de la cuticule déposée sur les denticules. La cuticule est déposée d'abord sur la denticule, suggérant une régulation du dépôt et de l'assemblage différente de celle des

cellules lisses (Moussian et al., 2006). La présence de la protéine Y uniquement dans les cellules à denticules renforce l'hypothèse d'une maturation spécifique à ces structures.

Enfin, Svb régule l'expression du gène miniature (*m*) dans les cellules à denticules. La première mutation de ce gène, m^1, a été caractérisée en 1910 par T.H Morgan et provoque une réduction de la taille de l'aile (Morgan T.H et al., 1916). Plus récemment, F. Roch (2003) a montré que cette réduction de l'aile est due à l'absence d'élongation des cellules épithéliales à la fin du stade pupal. De plus, les trichomes de l'aile sont déformées et ramifiées, montrant que M est nécessaire à la réorganisation de la forme des cellules de l'aile. Notre étude à permis de démontrer que Svb dirige l'expression de *m* dans les cellules à denticules et ceci de manière directe. Miniature est une protéine transmembranaire, avec une queue intra-cytoplasmique courte et une grande région extracellulaire contenant le domaine Zona Pellucida (ZP). Les protéines à domaine ZP ont initialement été identifiées chez les mammifères où trois de ces protéines constituent les composant majeurs de l'enveloppe extracellulaire des oocytes (pour revue (Jovine et al., 2005). Nous montrons ici que M est indispensable à la formation correcte des denticules, révélant ainsi une fonction inattendue des protéines ZPD dans la formation d'extensions cellulaires polarisées. L'absence de M génère des détachements localisés au niveau des denticules entre la cuticule et la membrane cellulaire, révélant une désorganisation de la matrice extracellulaire. L'accumulation de M, spécifiquement dans les denticules, révèle l'existence d'un sous-domaine membranaire particulier, suggérant que la composition même de la cuticule diffère entre les cellules à denticules et les cellules lisses.

Ce crible nous a donc permis d'identifier deux gènes, *m* et *y*, exprimés spécifiquement sous le contrôle de Svb et modifiant la composition de la matrice extracellulaire apicale qui recouvre les denticules. Ces données ouvrent de nouvelles perspectives dans le contrôle du changement de la forme cellulaire, montrant que des protéines extracellulaires apicales sont impliquées. Nous proposons que M établisse un lien direct entre la membrane apicale de la cellule et la cuticule, nécessaire au « sculptage » de la morphologie des denticules. De plus, nous mettons en évidence que deux autres gènes *ZPD* sont régulés par Svb, CG15335 et CG16798 (Tableau S1 de l'article). Pour mieux comprendre le rôle de la matrice extracellulaire apicale dans la modification de la forme cellulaire, nous développerons plus loin l'analyse des fonctions moléculaires de *m*, ainsi que celle des autres gènes *ZPD*, au cours de la morphogenèse épidermique embryonnaire.

II. La régulation des gènes cibles de Svb.

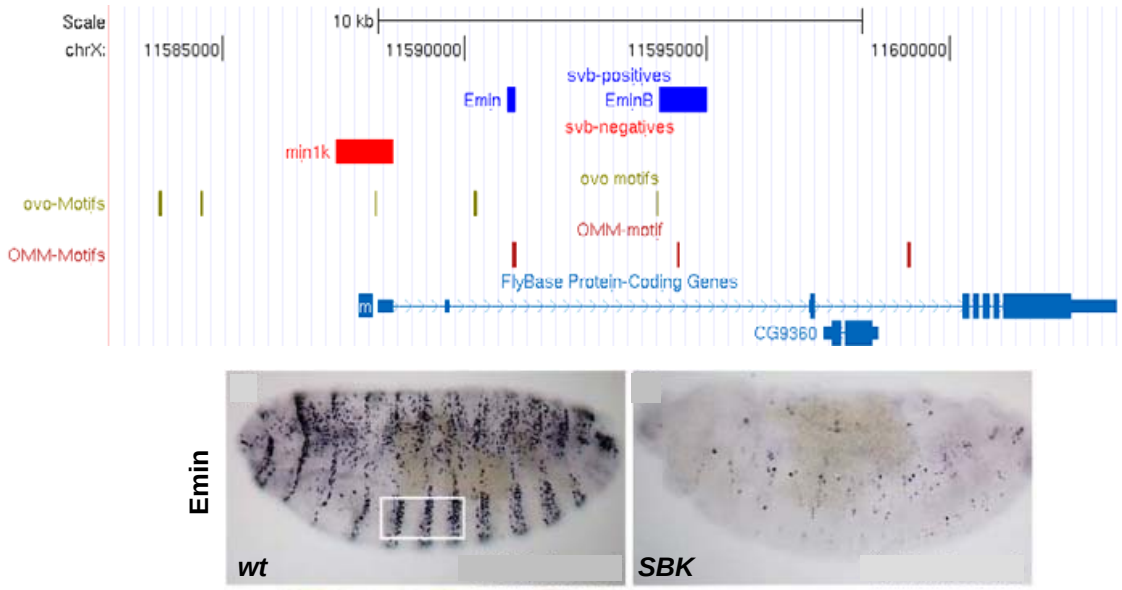
INTRODUCTION

La régulation de l'expression des gènes est un aspect fondamental du développement et de la différentiation cellulaire. Le principe général des mécanismes de régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes a été initialement proposé dès 1969 par Britten et Davidson. Les gènes co-exprimés, en réponse à un signal particulier, contiendraient des éléments de régulation communs ou *Cis Regulatory Module (CRM)*, responsables de leur activation transcriptionnelle (Britten and Davidson, 1969). Les signaux à l'origine de l'activation des gènes agissent en stimulant un gène spécifique, *intégrateur*, dont le produit active les gènes contenant des CRM correspondants. Ces modules de régulation représentent l'association de plusieurs séquences cis-régulatrices, dont le nombre et la distance peuvent varier. Ces séquences régulatrices correspondent à des sites de fixation, de 6 à 30 nucléotides de long, spécifiques de facteurs de transcription. La localisation génomique de CRM peut être variable au sein des régions non-codantes d'un gène, en amont et/ou en aval du gène et même dans les introns, et leur fonction est souvent indépendante de leur orientation. Bien que les premiers modèles de régulation aient été proposés il y a 40 ans, la compréhension de la régulation des gènes chez les eucaryotes reste encore très limitée. Un des enjeux importants est de pouvoir identifier à travers l'ensemble des régions non-codantes du génome ces éléments CRMs. Un certain nombre d'approches ont été développées, visant à identifier ces CRMs au sein des séquences génomiques entourant les gènes. Elles incluent schématiquement les démarches suivantes :

- découverte de motifs (*pattern discovery*) : à partir des séquences de gènes co-régulés, on peut rechercher des motifs nucléotidiques communs, surreprésentés dans les régions potentiellement régulatrices de ces gènes.
- localisation de motifs (*pattern matching*) : à partir de la spécificité de reconnaissance à l'ADN d'un facteur de transcription connu ou par la recherche des motifs consensus correspondants, bâtis autour de matrices positionnelles pondérées. Cette recherche s'effectue dans un ensemble de séquences non codantes, et favorise l'identification des regroupements locaux (clustering) de ces motifs.
- l'empreinte phylogénétique (*phylogenetic footprinting*) : Par rapport aux autres séquences non codantes qui évoluent relativement vite, les régions cis-régulatrices apparaissent comme des ilots de séquences évolutivement conservés entre espèces reliées phylogénétiquement.

Nous avons vu que Svb régule directement l'expression de *m*, via sa fixation sur un site consensus de liaison Ovo/Svb, évolutivement conservé. La recherche systématique des cibles génomiques de Svb, basée sur l'analyse des séquences intergéniques est un paradigme intéressant, pouvant bénéficier des différentes approches de prédiction. En effet, le site consensus de fixation des protéines Ovo/Svb à l'ADN est bien caractérisé et d'autre part nous disposons du séquençage des génomes de 12 espèces de drosophiles, dont le dernier ancêtre commun remonterait à plus de 120 My. Nos travaux ont de plus permis d'identifier un sous-ensemble des gènes cibles, dont la transcription est dépendante de Svb au cours la différentiation épidermique (Chanut-Delalande et al., 2006).

Armés de l'ensemble de ces connaissances, nous avons donc engagé un programme de recherche visant à identifier les cibles génomiques de Svb au cours de la morphogenèse épidermique. Pour ce faire, nous avons développé une combinaison d'approches complémentaires, faisant appel à de nouvelles méthodes prédictives en collaboration avec S. Aerts à Louvain ainsi qu'une analyse fonctionnelle des régions génomiques candidates.



<u>Figure 16 :</u> Schéma de l'organisation génomique du gène *m* et expression du CRM Emin.

Le gène est représenté en bleu-gris, les rectangles correspondent aux exons et les traits aux introns. Les boîtes bleues, Emin et EminB, correspondent aux CRM répondants à l'activité de Svb et capables de diriger une expression dans les cellules à trichomes. Les carrés rouges représentent les régions génomiques prédites mais ne présentant pas d'activité transcriptionnelle dans l'embryon.

Vues latérales d'embryons au stade 16, après une immunocoloration anti-lac z. Le CRM Emin dirige l'expression du rapporteur lacZ dans l'ensemble de cellules à trichome, reproduisant ainsi l'expression endogène de *m*. L'activité de ce CRM est dépendante de Svb puisqu'elle est abolie dans un contexte *svb* mutant.

SBK : mutant du gène *svb* et *buttonhead* (*btd*), cette dernière mutation produisant un défaut de la formation de la tête, permettant l'identification phénotypique des embryons mutants.

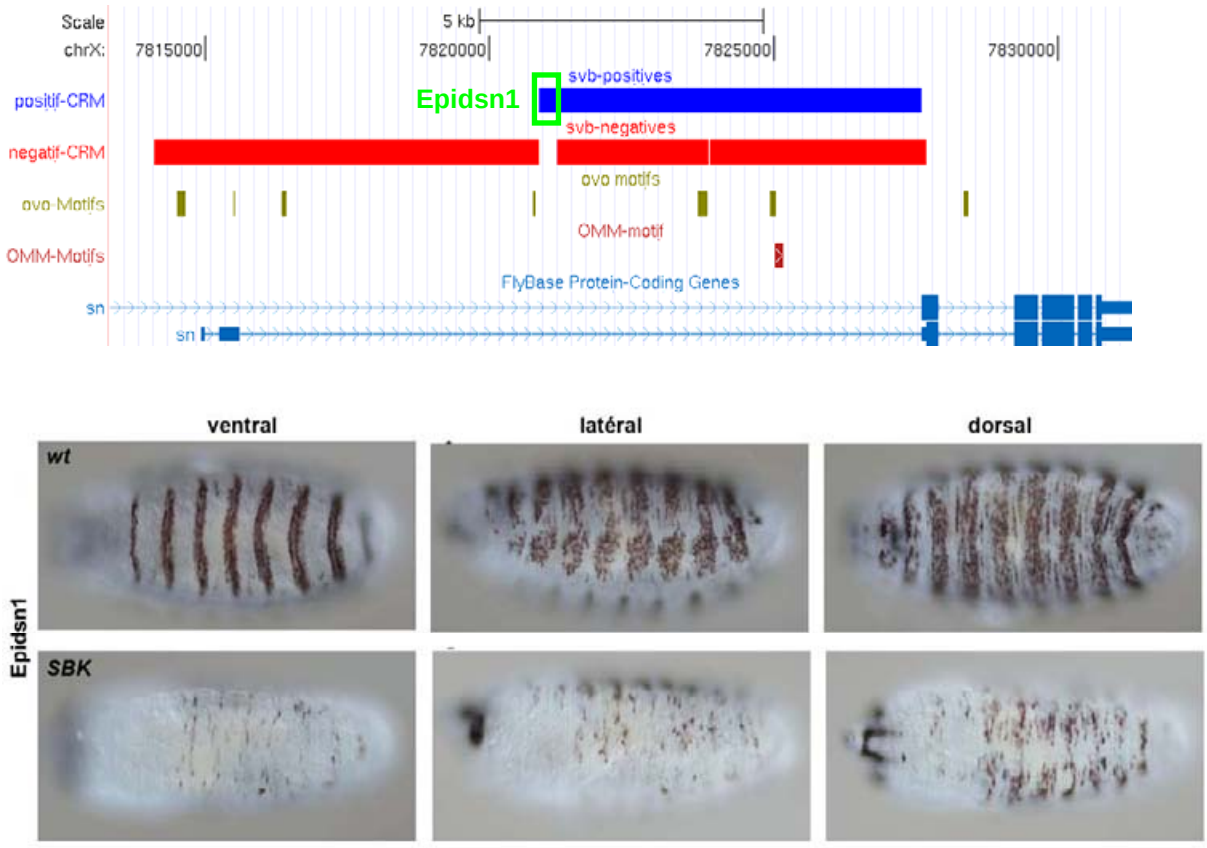
RESULTATS

1) Cibles directes du facteur Svb dans l'épiderme.

a) M est une cible directe de Svb : conservation évolutive du motif Ovo.

Les régions régulatrices, ou CRM, apparaissent souvent comme des blocs de conservation évolutive au sein des séquences non codantes intergéniques et introniques (Bergman et al., 2002; Vavouri and Elgar, 2005). Suite à l'analyse des mécanismes de régulation transcriptionnelle au cours du développement précoce, notamment au stade blastoderme, le regroupement local (clustering) de sites de fixation pour un même facteur de transcription est souvent considéré comme une signature caractéristique des CRM (Bergman et al., 2002). Le site consensus de fixation du facteur de transcription Ovo est bien défini *in vitro* TTACMGTTACA, (Lu et al., 1998); ACNGTTACA, (Garfinkel et al., 1994). L'analyse *in vivo* de la régulation de l'expression d'*otu*, une cible d'Ovo dans les cellules germinales femelles, montre le clustering de trois sites de fixation pour Ovo dans une région régulatrice compacte autour du point d'initiation. Cette région fixe spécifiquement la protéine Ovo *in vitro* et est suffisante pour diriger *in vivo* l'expression d'un rapporteur (Lu and Oliver, 2001). Ces résultats identifient donc *otu* comme un gène de cible direct d'Ovo pour la différenciation de la lignée germinale.

Pour comprendre comment Svb régule la transcription de ses cibles pour morphogenèse épidermique, nous avons recherché la présence des sites Ovo, regroupés et conservés évolutivement, dans les séquences intergéniques des gènes cibles précédemment identifiés L'analyse comparée des génomes de *D. melanogaster, D. pseudobscura* et *D. virilis,* basée sur l'alignement local des séquences, met en évidence la présence de sites Ovo évolutivement conservés dans six des gènes cibles : *forked* (*f*), *singed* (*sn*), *miniature* (*m*), *dusky-like* (*dyl*), *nyobe* (*nyo*) et *morpheyus* (*mye*). Nous avons testé, *in vivo*, la fonctionnalité des régions génomiques centrées autour de ces motifs. Par des approches désormais classiques de lignées transgéniques, plaçant l'expression d'un gène rapporteur lacZ sous le contrôle des régions à tester, nous avons analysé l'activité transcriptionnelle de ces séquences. Les premiers résultats de ces approches se sont avérés décevants, une seule région, celle identifiée pour *m,* montre une activité de régulation transcriptionnelle dans les cellules à trichomes. Cette région qui se situe dans le 2ème intron de *m,* a pu être ensuite réduite à un court fragment de 180bp qui ne possède qu'un seul motif de fixation Ovo/svb (figure 16). Nous avons montré que cette région



<u>Figure 17 :</u> Schéma de l'organisation génomique du gène *sn* et expression du CRM Epidsn1.

Le rectangle vert correspond à la séquence régulatrice minimale, Epidsn1 (~ 600pb), capable de conduire l'expression du transgène lac z à l'identique du gène *sn* endogène.

Vues ventrales, latérales et dorsales d'embryons au stade 16, après immuocoloration anti-lacZ. Le CRM Epidsn1 reproduit l'expression du gène *sn* dans les cellules à trichomes et son activité est sous la dépendance de Svb.

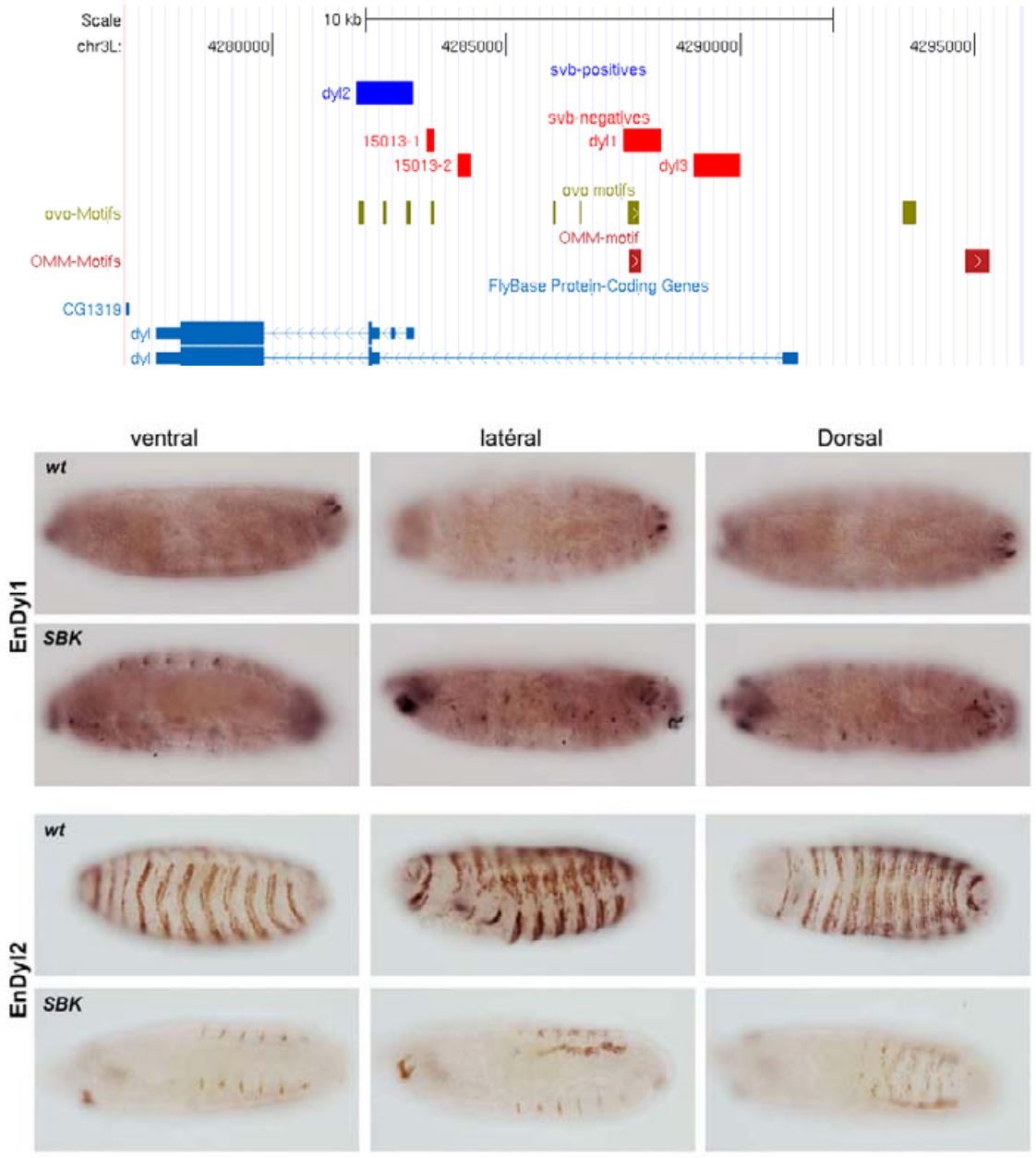
dirige une expression épidermique spécifique des cellules à trichomes et dont l'activité est sous la dépendance de Svb (Chanut-Delalande et al., 2006). En effet, l'introduction de deux substitutions nucléotidiques dans ce motif empêche la fixation de Svb *in vitro* et inactive les propriétés transcriptionnelles de cet élément *in vivo*. Ces résultats démontrent donc que les isoformes protéiques (qui contiennent le même domaine de reconnaissance à l'ADN), Ovo dans la lignée germinale et Svb dans l'épiderme, régulent l'expression de leurs gènes cibles respectifs en se fixant à des motifs partageant des séquences identiques.

b) Les régulateurs de l'actine : *singed* et *shavenoïd*

Comme ces approches prédictives s'étaient avérés peu efficaces, nous avons entrepris des analyses *in vivo* systématiques, par le test des régions génomiques des gènes *singed (sn*) et *shavenoïd* (*sha*).

Jennifer Zanet, post-doctorante au laboratoire s'est attachée à l'étude des fonctions du gène *singed* (Zanet et al., 2009) et des mécanismes régulant son expression spécifique dans des sous-populations cellulaires. Par la construction d'une batterie systématique de lignées transgéniques, rapporteurs d'activité transcriptionnelle, Jennifer a pu définir que le premier intron de 7kb reproduit le profil d'expression épidermique de *sn*. Ce fragment a été sous-divisé en deux régions de ~3Kb, et l'une contient toutes les informations nécessaires à l'expression épidermique (figure 17). Cette région a ensuite été réduite jusqu'à un fragment de 617pb contenant deux sites Ovo, et produisant un profil épidermique identique à celle de la transcription de *sn* dans les cellules à trichomes. Ces travaux ont ainsi délimité fonctionnellement une deuxième région cis-régulatrice dont l'activité dépend du facteur Svb.

Lors de son stage de DESU, Séverine Viala a utilisé une approche similaire pour rechercher les CRM dirigant l'expression épidermique du gène *sha*. Deux fragments BS1 et BS3, d'environ 600 bp chacun, contenant des sites consensus Ovo évolutivement conservés dirigent une expression épidermique dans les cellules à trichomes, reproduisant celle du gène *sha* endogène (résultats non présentés). La protéine Svb se fixe *in vitro* sur ces régions cis-régulatrices, suggérant fortement que *sha* est une cible directe de Svb. Cette analyse illustre aussi que la conservation évolutive d'un site consensus n'est pas suffisante pour prédire la localisation des CRM actifs *in vivo*. En effet, les fragments BS0 et BS2, eux aussi identifiés sur cette base et capables de fixer Svb *in vitro,* ne présentent aucune activité pour la transcription d'un gène rapporteur *in vivo*.



<u>Figure 18 :</u> Schéma de l'organisation génomique du gène *dyl* et expression des CRM.
La région EnDyl1 ne montre aucune expression. Le CRM EnDyl2 reproduit l'expression du gène *dyl* sous la dépendance de Svb.

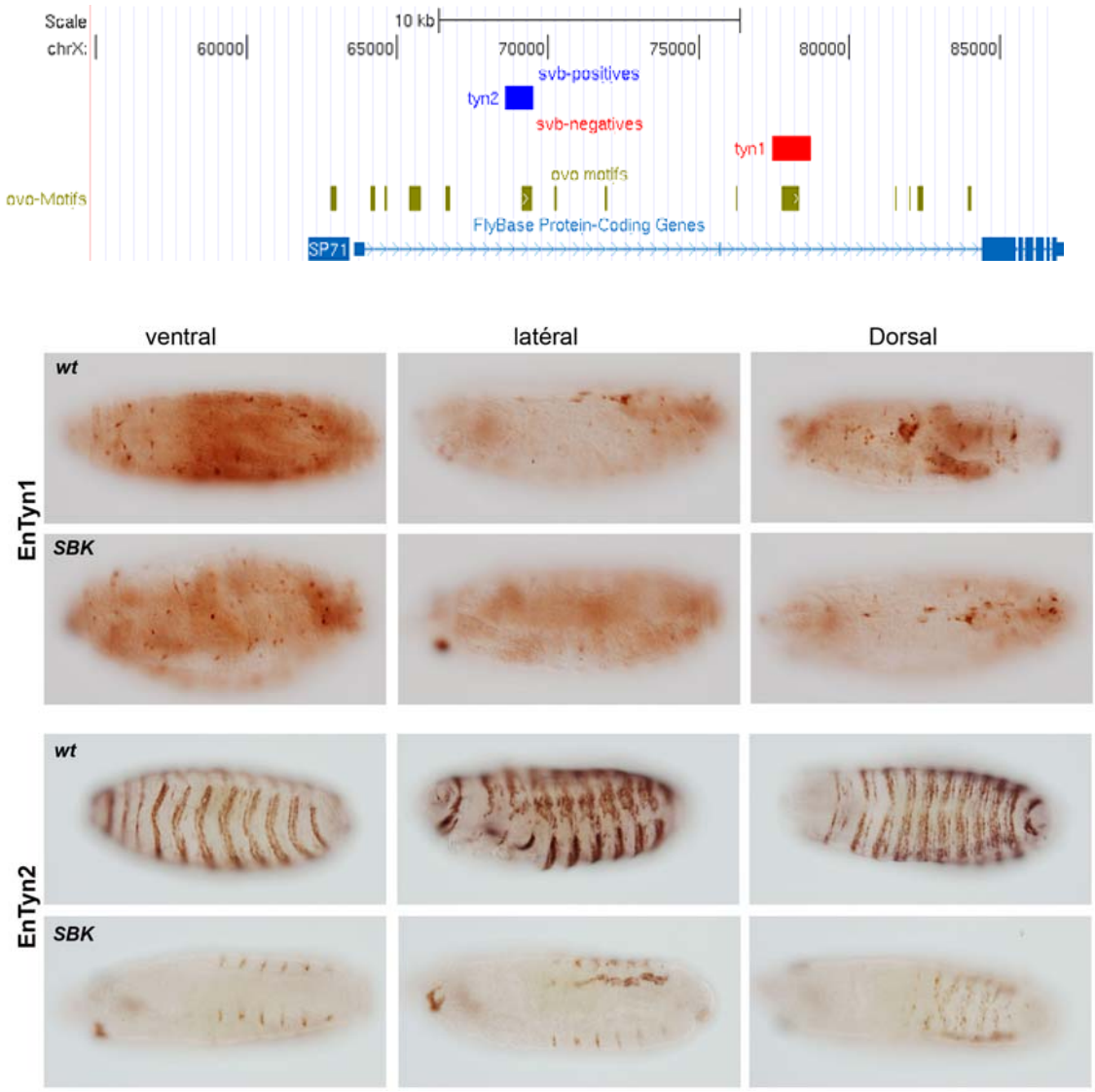
L'ensemble de ces données montre que la conservation évolutive de motifs nucléotidiques correspondant au site de fixation Ovo/Svb n'a qu'une faible valeur prédictive pour identifier des CRMs fonctionnels *in vivo*. Nous avons alors développé des approches alternatives conjuguant d'autres méthodes de prédiction et d'analyses *in vivo* afin d'identifier de nouvelles cibles génomiques de Svb.

2) Prédiction et test *in vivo* des CRM liées par Svb.

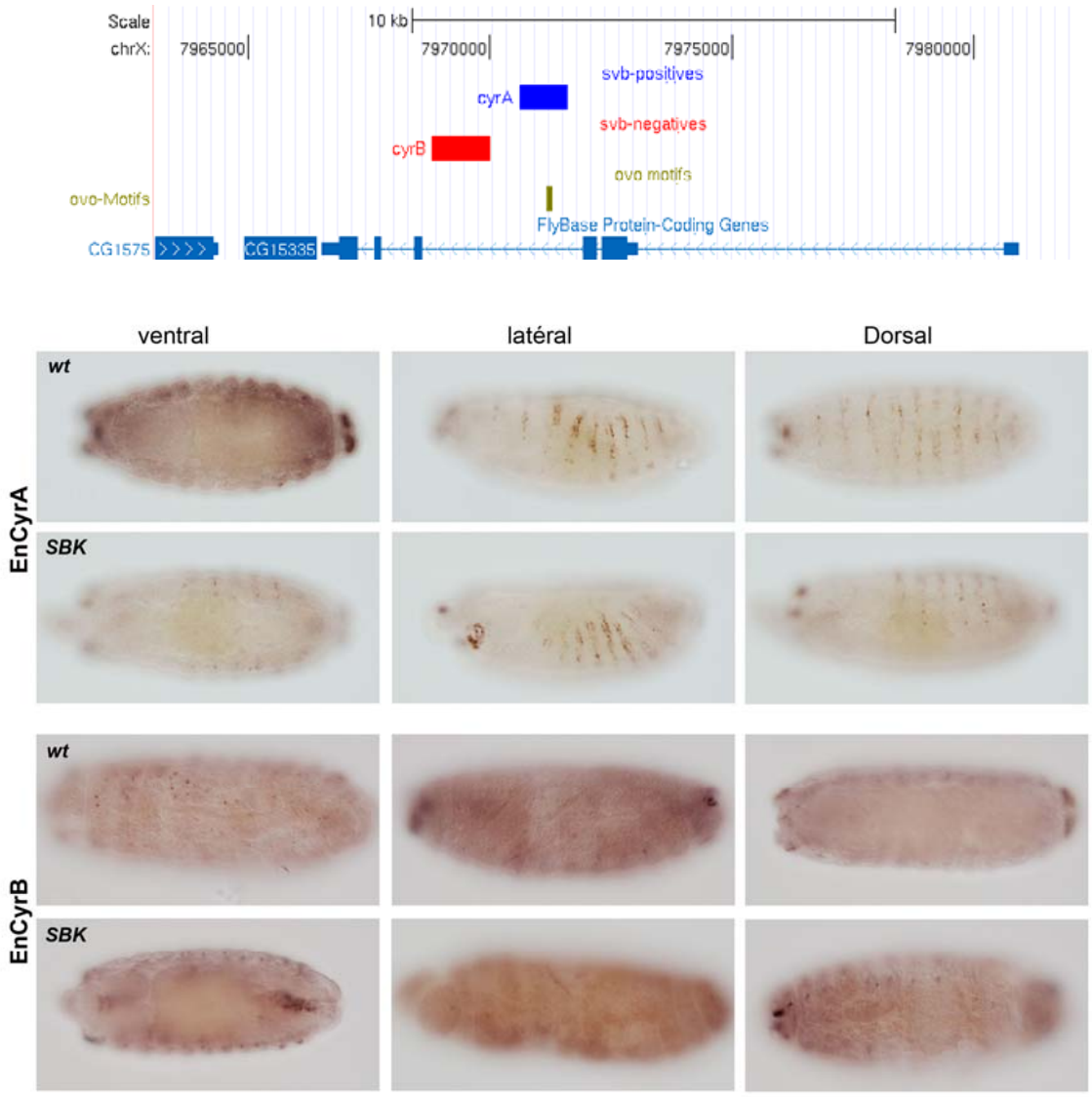
En collaboration avec S. Aerts, nous avons utilisé une méthode bioinformatique, développée pour détecter des motifs statistiquement surreprésentés dans un jeu de gènes co-exprimés, par rapport à l'ensemble des gènes de la drosophile (Aerts et al., 2007). Le programme « CisTargetX », intégrant l'analyse évolutive et des méthodes statistiques non basées sur des alignements locaux, a été utilisé pour l'analyse des 18 gènes cibles de Svb identifiés à cette période. Cette analyse porte sur les régions génomiques situées jusqu'à 5Kb en amont ou en aval de chaque gène, ainsi que celles correspondant à tous les introns. « CisTargetX » analyse ensuite ces séquences, dans les 12 génomes de Drosophile en parallèle, pour établir une liste pondérée de chacun de motifs, statistiquement enrichis dans les 18 gènes cibles de Svb. Les motifs analysés correspondent à une bibliothèque de 2000 sites de fixation connus pour des facteurs de transcription ainsi que des motifs conservés au cours de l'évolution (Elemento and Tavazoie, 2005).

Cette analyse montre que le motif Ovo est significativement surreprésenté dans l'ensemble des gènes cibles régulées par Svb, par rapport aux autres gènes de la drosophile et même par rapport à d'autres gènes épidermiques mais dont l'expression ne dépend pas de Svb. Si les motifs correspondants au site de fixation des protéines Ovo et Svb sont statistiquement enrichis dans ces gènes cibles, il faut noter qu'on ne détecte pas de regroupement local de ces sites, mais de 1 à 3 sites dans des régions de taille comprise entre 600pb et 1kb. Nous avons ainsi défini une liste de 17 CRMs candidats, à partir de 6 gènes cibles différents, dont 4 gènes ZPD : *dyl*, *tyn*, *nyo* et *cyr*, sur lesquels mes travaux ont plus particulièrement été centrés.

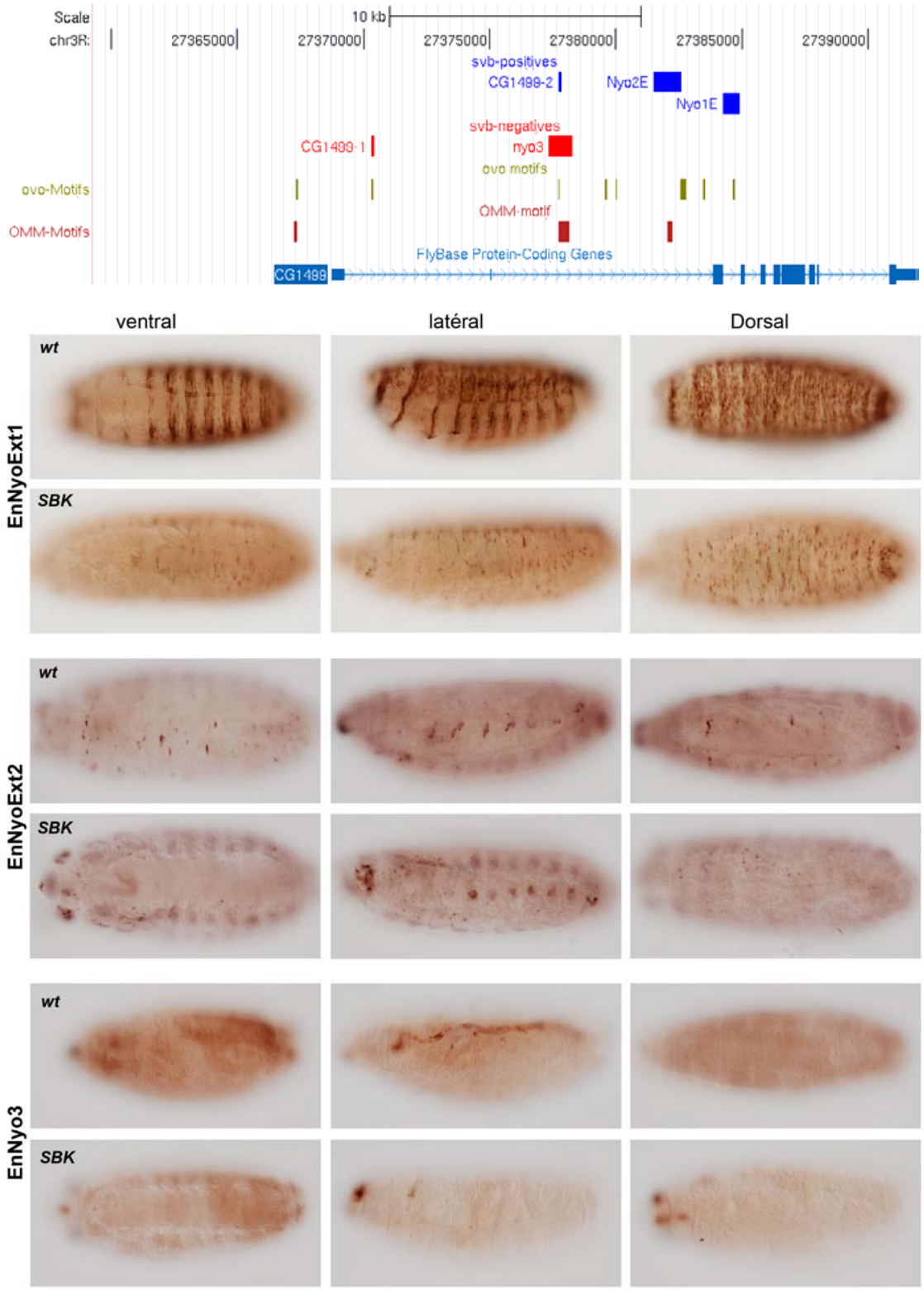
Pour tester la fonctionnalité *in vivo* de ces CRMs prédits par « Cis-TargetX », nous avons développé l'utilisation d'une nouvelle méthode de transgénèse, utilisant la recombinaison site spécifique PhiC31 (Bischof et al., 2007). Les régions testées correspondent à des fragments d'environ 1kb, centrés sur la position du(es) site(s) de liaison potentiel(s), insérés dans un



<u>Figure 19 :</u> Schéma de l'organisation génomique du gène *tyn* et expression des CRM.
La région EnTyn1 ne montre aucune expression. Le CRM EnTyn2 reproduit l'expression du gène *tyn* sous la dépendance de Svb.



<u>Figure 20 :</u> Schéma de l'organisation génomique du gène *cyr* et expression des CRM.
LA région EnCyrB ne présente aucune activité régulatrice. Le CRM EnCyrA reproduit l'expression du gène *cyr* sous la dépendance de Svb.

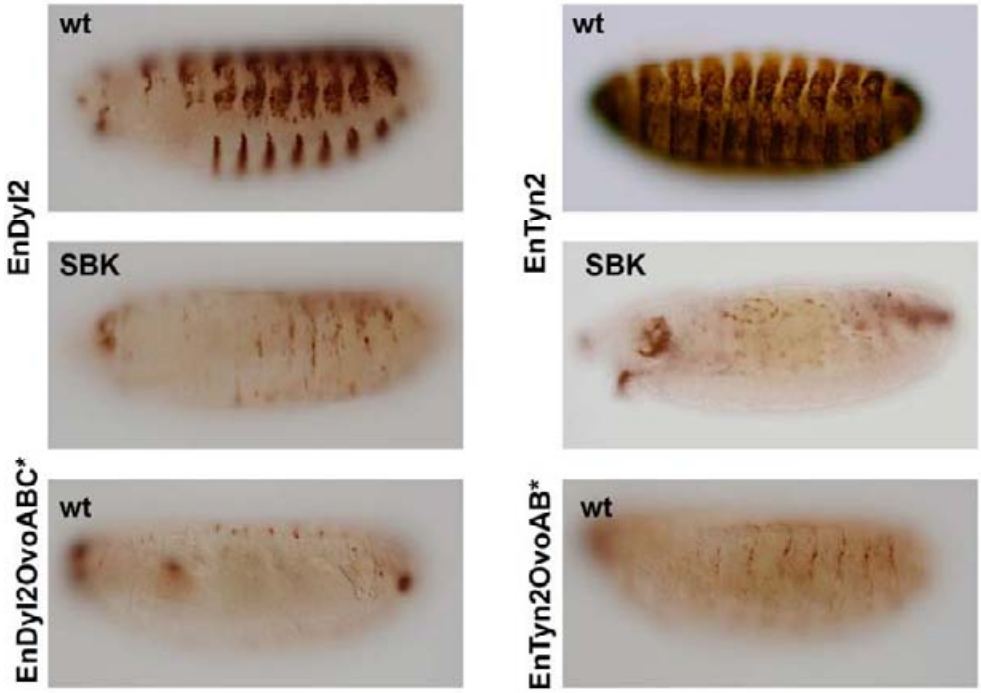


<u>Figure 21 :</u> Schéma de l'organisation génomique du gène *nyo* et expression des CRM.
Le CRM EnNyo1Ext reproduit l'expression du gène *nyo* sous la dépendance de Svb. La région EnNyo2Ext présente une faible activité transcriptionelle dans certaines cellules épidermiques, qui semble être sous la dépendance de Svb. La région EnNyo3 ne montre aucune activité transcriptionnelle.

vecteur rapporteur lac Z, contenant les séquences AttB (Markstein et al., 2008). Ce système présente l'avantage de s'intégrer dans une plateforme génomique (AttP) déterminée et donc à une position chromosomique connue et invariante entre différentes lignées. Chaque élément potentiellement régulateur est donc placé dans le même environnement chromatinien, évitant l'influence de la variation des sites d'insertion sur l'expression des différentes lignées transgéniques. Par cette approche, nous avons testé 9 CRMs candidats: 2 CRMs pour *dyl,* 2 CRMs pour *cyr* , 2 CRMs pour *tyn* et 3 CRMs pour le gène *nyo* .

Les CRM présomptifs du gène *dyl* correspondent à deux régions de ~1kb, localisées dans le premier intron (Endyl1) et autour du deuxième exon (Endyl2). Seul Endyl2 montre une activité dirigeant l'expression du gène lac Z similaire à celle du gène *dyl* endogène dans les cellules à denticules (figure 18). La fonction du CRM Endyl2 dépend de l'activité de *svb*, car l'expression du rapporteur est abolie dans des embryons mutants pour *svb* (figure 18). Les régions testées pour le gène *tyn* sont localisées dans le deuxième (Entyn1) et le premier intron (Entyn2). Alors que le CRM Entyn1 apparait non fonctionnel, Entyn2 dirige l'expression du gène rapporteur dans les cellules à trichomes, sous la dépendance de Svb (figure 19). De même, nous avons identifié un CRM fonctionnel et dépendant de Svb pour les gènes *cyr :* EncyrB (figure 20) et Nyo : Ennyo1Ext (figure 21).

Enfin, nous avons testé l'influence fonctionnelle des motifs correspondants aux sites consensus de liaison pour Ovo/svb. Le CRM Endyl2 comporte trois motifs potentiels et le CRM Entyn2 deux motifs potentiels Ovo/svb (en vert figure 18 et 19). L'inactivation simultanée, par introduction de 2 substitutions par motif, des sites de liaison potentiels, conduit à la perte de l'activité transcriptionnelle de ces deux éléments, Endyl2-OvoABC* et Entyn2-OvoAB*(figure 22). Ces résultats suggèrent donc que le facteur Svb se fixe directement sur ces motifs, dont l'influence individuelle et l'éventuelle coopérativité, au sein de chaque élément restent à évaluer. En résumé, sur les 9 régions testées *in vivo*, 4 présentent une activité transcriptionnelle dépendante de la fonction Svb dans les cellules épidermiques. Pour *dyl* et *tyn*, cette activité nécessite l'intégrité de motifs consensus pour la fixation des protéines Ovo/svb, suggérant que ces deux CRM sont des cibles génomiques directes du facteur de transcription Svb dans l'épiderme. Ces travaux permettent d'allonger à 7, la liste des CRMs dépendants de Svb que nous avons identifié.



<u>Figure 22 :</u> Importance des sites de liaison Ovo/Svb pour la fonction des CRM des gènes *dyl* et *tyn*.

Vues latérales d'embryons au stade 16. Le CRM EnDyl2 reproduit l'expression endogène du gène *dyl* et cette expression est dépendante de Svb. Ce CRM contient 3 sites Ovo/Svb. La mutation simultanée de ces trois sites dans le CRM EnDyl2 (OvoABC*) abolit l'expression du transgène. Le CRM EnTyn2 reproduit l'expression endogène du gène *tyn* et cette expression est dépendante de Svb. Ce CRM contient 2 sites Ovo dont la mutation (OvoAB*) abolit l'expression du transgène.

3) Modélisation des CRMs : vers l'identification de nouvelles cibles.

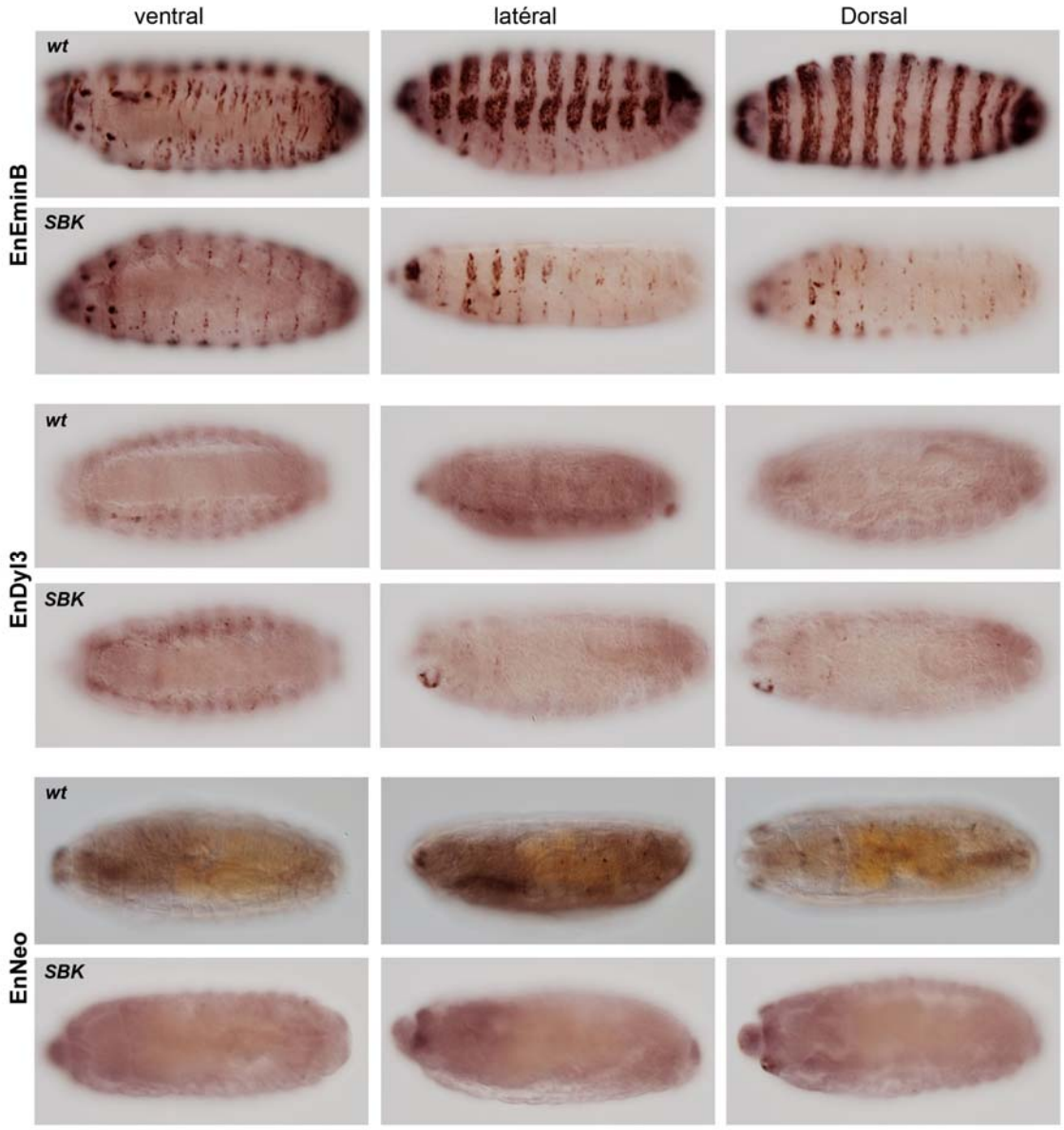
L'un des enjeux majeurs est donc de comprendre ce qui différencie les CRM actifs *in vivo* de l'ensemble des autres régions contenant des motifs évolutivement conservés. L'hypothèse la plus simple est d'inférer l'existence d'autres éléments cis-régulateurs, dont la présence est nécessaire à la fonctionnalité des sites de fixation pour Svb *in vivo*. Nous avons donc recherché des motifs nucléotidiques statistiquement enrichis dans les 7 CRM fonctionnels, par rapport à l'ensemble des régions génomiques contenant un site consensus de Ovo mais ne dirigeant pas d'expression dans l'épiderme. Le programme CisTarget X recherche alors la présence de sites statistiquement enrichis autour des sites Ovo/Svb. Ces analyses détectent en effet une signature significativement associée aux 7 CRM actifs, correspondant à deux « modèles » différents, bien que partiellement recouvrant.

- Le modèle OG : est basé sur la présence simultanée de sites consensus pour deux facteurs de trancription, Ovo d'une part et Grainyhead (Grh) d'autre part.
- Le modèle OMM : est basé sur la présence simultanée de sites consensus pour Ovo et Myb, plus celle d'un motif « orphelin », ACCGATTA.

Ces modèles prédictifs nous ont conduits à tester de nouvelles régions génomiques des gènes cibles de Svb. Nous avons établi une liste de 23 nouveaux CRMs candidats, dont 4 correspondent à des régions intergéniques des gènes ZPD : *m*, *dyl*, *neo* et *dp*, et engagé le test de leur activité *in vivo* par la génération de lignées transgéniques rapportrices.

Cette analyse révèle la présence d'un deuxième CRM fonctionnel dans le gène *m*. L'élément, EminB, dirige un profil d'expression épidermique incomplet vis-à-vis de l'expression endogène. Il révèle une forte expression dans les cellules à trichome dorsales et latérales et seulement une activité résiduelle dans les cellules à denticules ventrales (figure 23). L'activité de ce CRM de type OMM est cependant sensible à *svb*, car son activité transcriptionnelle est abolie dans un embryon mutant pour *svb*. Il est donc possible que ce deuxième CRM contribue à renforcer l'expression du gène *miniature* dans les cellules à trichomes dorsales.

Nous avons aussi testé un nouveau CRM pour le gène *dusky-like*, Endyl3, correspondant simultanément aux deux modèles OG et OMM (figure 18). Toutefois, ce fragment s'est révélé

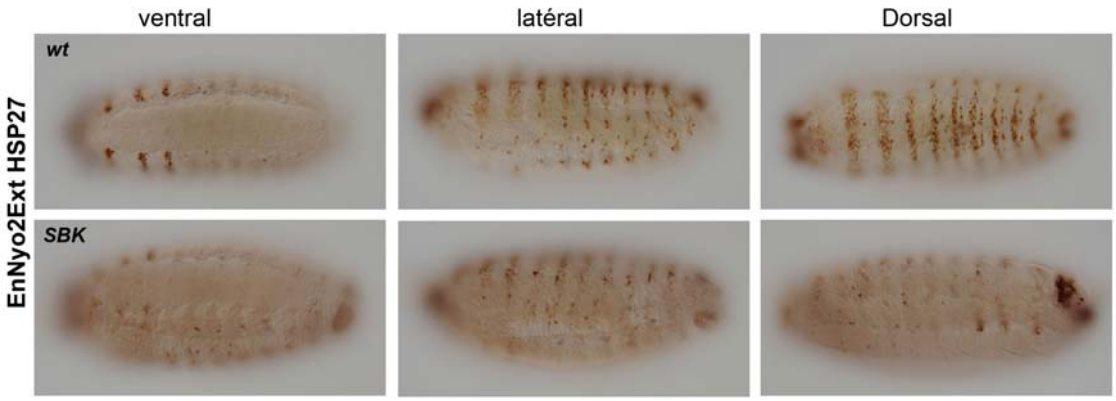


<u>Figure 23 :</u> Expression des nouveaux CRMs isolés.
Immunocoloration anti-lac z. Le CRM EminB reproduit partiellement l'expression de *m*, dans les cellules à trichomes latérales et dorsales, sous le contrôle de Svb. Les CRMs EnDyl3 et EnNeo ne montrent aucune expression.

inactif en transcription, suggérant que cette région ne contribue pas à la régulation de la transcription de *dyl* dans l'épiderme (figure 23). De même, le CRM candidat EnNeo prédit sur la base du modèle OG, correspond à une région inactive en transcription, nous laissant donc sans information sur la régulation trancriptionnelle du gène *neo* (figure 23). De façon surprenante, les analyses bio-informatiques prédisent un CRM sur le modèle OMM dans *dumpy (dp),* un gène codant une protéine ZPD, exprimé dans l'épiderme embryonnaire, mais dont la transcription n'est pas sensible à l'activité de Svb. Nous montrons que cette région génomique dirige une expression épidermique, avec l'alternance de fines bandes de cellules restreintes à la partie ventrale de l'embryon et avec une intensité décroissante vers le postérieur. Toutefois, l'activité transcriptionnelle de cet élément ne dépend pas de Svb, puisque ce profil d'expression est inchangé dans les mutants *svb* (résultats non présentés).

En résumé, cette étude a permis l'identification d'un CRM supplémentaire pour les gènes ZPD, ainsi que celle de nouveaux gènes cibles du facteur Svb (données non présentées). Parmi les 11 gènes cibles publiés en 2006, nous avons pu étendre à 7 (*sn*, *f*, *m*, *sha*, *cyr*, *tyn*, *dyl*) le nombre de gènes régulées directement par Svb (Chanut-Delalande et al., 2006). La complémentarité des approches informatiques et expérimentales apparaît donc indispensable. Ainsi, nous avons pu définir qu'une séquence régulatrice répondant à Svb possèdent une longueur comprise entre 200pb et 1Kb avec 1 à 3 sites Ovo/Sbv réparti sur le long de cette séquence. Chacune de ces séquences est capable de fonctionner de manière autonome, bien que certaines différences entre les CRM peuvent être notées : les CRM dirigeant une expression forte et complète (Emin, Epidsn1, ShaBS3, EnDyl2, Entyn2 et EnNyo1Ext), ou les CRM dirigeant une expression faible et/ou partielle (EminB, ShaBS1, EnCyrA, EnNyo2Ext).

De plus, nos données suggèrent que la présence de certains motifs à proximité du site Ovo (modèle OMM) pourrait être une signature de l'utilisation fonctionnelle de ce site *in vivo* dans l'épiderme. Par exemple, il est possible qu'il existe une coopérativité entre Svb et d'autres facteurs de transcription pour l'expression des effecteurs cellulaires, dans le sous ensemble des cellules épidermiques à trichomes.

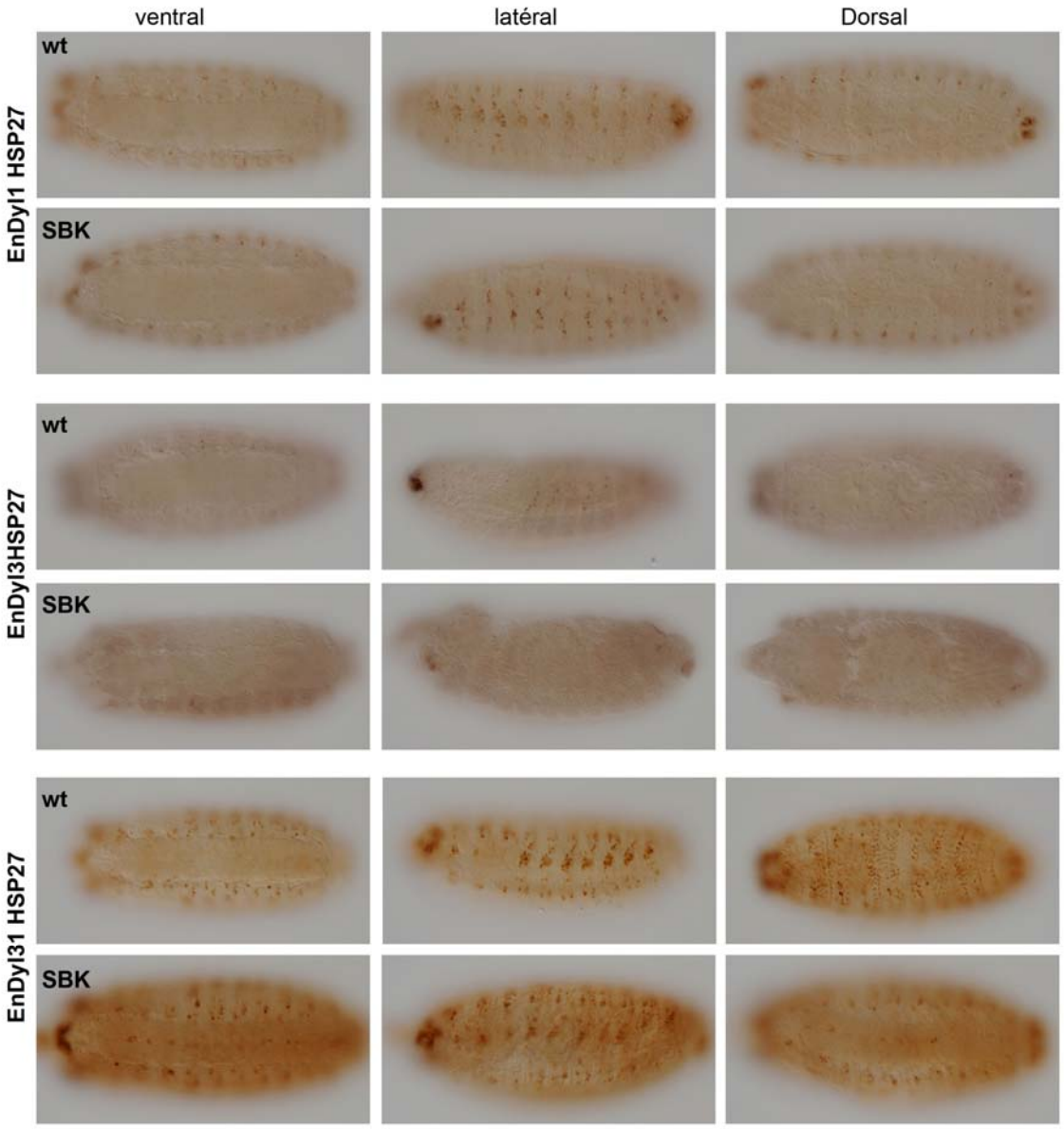


<u>Figure 24 :</u> Expression du CRM EnNyo2Ext HSP27.
Le promoteur Hsp70 du vecteur pATTB a été remplacé par le promoteur Hsp27 du vecteur pCβ. Ce remplacement a aussi ramené la séquence NLS permettant la localisation nucléaire de la βgal transgénique. Ce changement de promoteur permet d'améliorer l'expression du CRM, établissant que la nature du promoteur minimal utilisé n'est pas neutre sur l'activité transcriptionnelle des CRM (comparer avec la figure 21).

DISCUSSION

La morphogenèse épidermique embryonnaire offre un modèle intéressant dans la compréhension de la régulation par un même facteur d'un ensemble de gènes au cours d'un processus de différenciation terminale. Svb régule, via sa fixation directe sur un site consensus Ovo/Svb, l'expression de trois gènes ZPD : *m, tyn* et *dyl*. De plus, nous avons identifié des CRM actifs pour deux autres gènes ZPD : *nyo* et *cyr*. L'absence d'expression dirigée par ces deux CRMs dans un contexte mutant pour *svb* montre la dépendance fonctionnelle de ces séquences à Svb. Il sera intéressant de muter les sites Ovo pour ces deux derniers CRMs, afin de tester si ces deux gènes sont eux aussi des cibles directes de Svb. Il reste encore à identifier les CRMs dirigeant l'expression épidermique des gènes *mye* et *neo*. Le seul CRM prédit pour *neo* ne montre aucune activité et nous n'avons pas obtenu pour l'heure de prédictions de CRM pour le gène *mye*. Malgré des limites évidentes, ces analyses bioinformatiques ont donc significativement amélioré la prédiction des séquences régulatrices fonctionnelles *in vivo*.

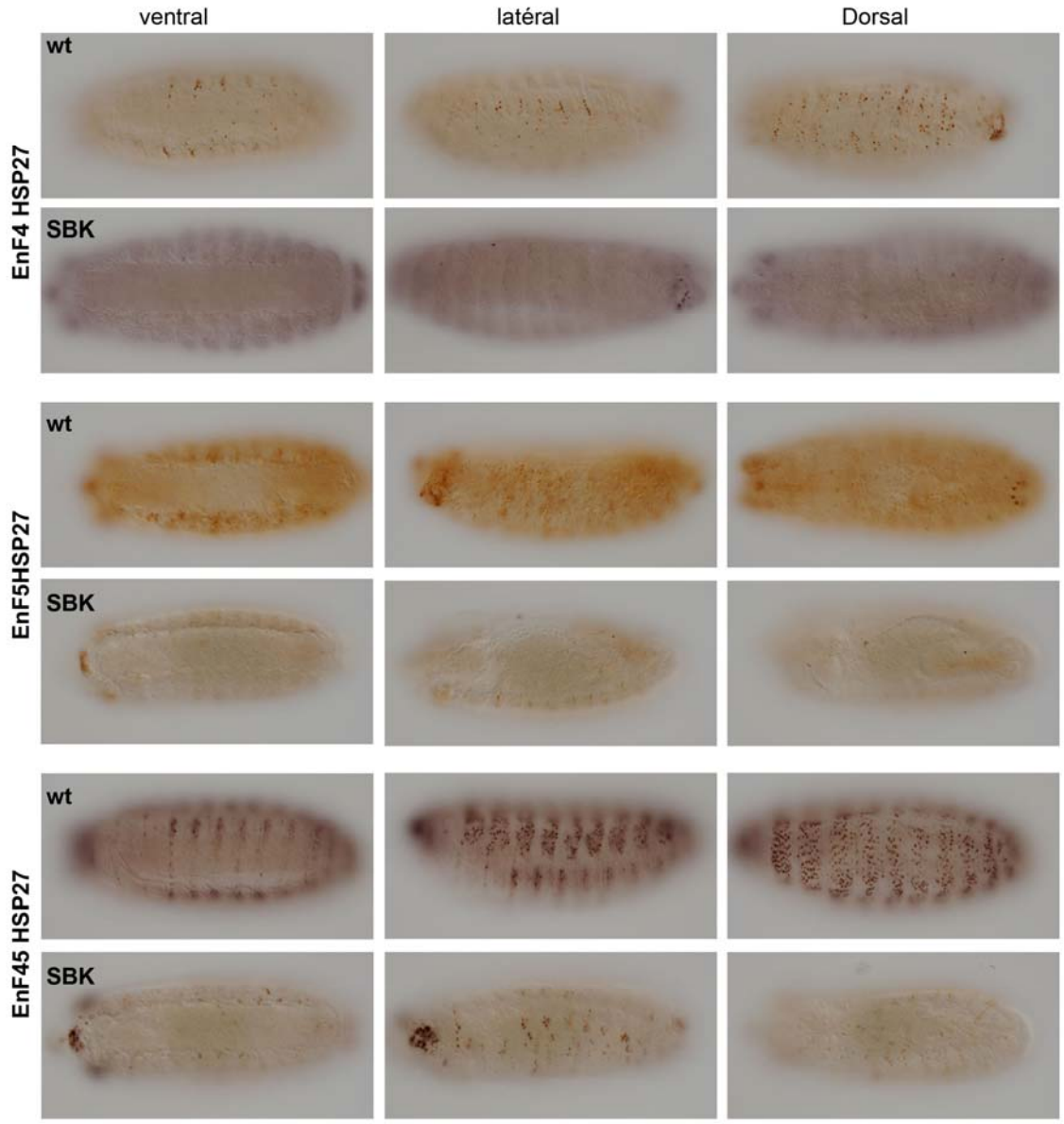
Les CRMs identifiés pour les gènes *dyl* et *tyn* sont contenus chacun dans une région de 1kb et comprennent deux sous régions dans lesquelles sont concentrés tous les motifs détectés (figures 18 et 19). Il reste à tester les effets de l'inactivation individuelle de chaque site Ovo/Svb sur l'activité régulatrice des deux CRMs ainsi qu'à identifier le fragment minimum portant l'activité. Il deviendra alors possible de mener une approche systématique par « linker scanning » pour identifier, en plus des sites Ovo, l'ensemble des autres motifs cis-régulateurs nécessaires à la fonction de ces éléments. Les tentatives de modélisation des CRM médiant la réponse transcriptionnelle à Svb montre en effet l'existence de plusieurs motifs statistiquement surreprésentés dans les gènes cibles de Svb, en plus des sites Ovo. Des analyses systématiques *in vivo* permettront de tester la fonction éventuelle des motifs identifiés *in silico*. Serge Plaza vient en effet de réaliser une étude de ce type sur un CRM de *m.* Lorsque le site Ovo est muté, l'activité régulatrice du CRM de *m* est nulle, montrant que Svb doit se fixer sur ce site. Les expériences de « linker scanning » de cet élément révèlent en outre l'importance de différentes régions d'ADN, elles aussi nécessaires à la pleine activité régulatrice du CRM de *m*. Le challenge est maintenant de découvrir quels sont les facteurs en *trans* reconnaissent ces motifs et comment ils pourraient interagir fonctionellement avec le facteur Svb.



<u>Figure 25 :</u> Expression des CRMs EnDyl1, EnDyl3 et EnDyl31.
La région EnDyl1 dirige une faible expression du transgène en latéral, qui semble être sous la dépendance de Svb, alors que cette même région sous le contrôle du *hsp70* ne montrait aucune expression. La région EnDyl3 ne montre elle aucune activité transcriptionnelle, comme précédemment (comparer avec la figure 18). Enfin, la région EnDyl31 montre une activité suppérieure à celle de la région EnDyl1 seule, surtout en dorsal. Toutefois, la combinaison des deux séquences n'est pas suffisante pour reproduire l'expression complète du gène *dyl*, montrant qu'il n'existe pas de coopérativité entre ces deux régions.

La combinaison de prédictions *in silico* et d'analyses *in vivo* suggèrent donc fortement que la régulation de la transcription d'un gène par Svb requiert la liaison d'autres facteurs *trans*-régulateurs, dont nous ne connaissons pour le moment que les motifs de fixation. En effet, de nombreux sites Ovo/Svb sont retrouvés dans les séquences intergéniques de ses gènes cibles, sans pour autant être tous utilisés *in vivo*. Nos analyses montrent l'existence de motifs additionnels significativement associés à l'activité transcriptionnelle des régions génomiques testées. Ces données suggèrent donc que ces motifs permettraient de définir collectivement un CRM dirigeant l'expression dans certaines cellules épidermiques. Une première hypothèse serait que ces sites recrutent des co-facteurs transcriptionnels, nécessaires *in vivo* à la fixation ou à la stabilisation de la liaison de Svb sur ces sites. Alternativement, ces motifs pourraient participer directement à la régulation de la structure de la chromatine, par exemple, en positionnant les nucléosomes.

Comme dans le cas du gène *m*, nous montrons que *dyl* et *tyn* sont régulés directement par Svb, grâce à sa fixation sur des sites Ovo/Svb. Dans le cas du gène *dyl*, parmi les trois CRM prédits, seul le fragment Endyl2 présente une l'activité transcriptionnelle. Cependant, il reste possible que les approches « rapporteur » ne permettent pas de détecter toutes les régions fonctionnelles *in vivo*. La nature et la topologie des communications « enhancer/promoteur » peuvent avoir une influence importante sur l'expression du transgène. Nous montrons par exemple l'obtention de résultats différents suivant le promoteur réputé « naïf » utilisé dans différentes constructions rapportrices. La région EnNyo2Ext montre une activité transcriptionnelle significative (et dépendante de Svb) dans les cellules à trichomes, avec un vecteur la plaçant en amont du promoteur minimal *hsp27* (figure 24), alors que cette même région ne permet pas l'expression du rapporteur avec le promoteur minimal *hsp70*. Par contre, le passage dans un vecteur utilisant le promoteur *hsp27* ne modifie pas la nature des résultats obtenus pour les régions EnDyl1 et EnDyl3, qui restent inactives (figure 25). Il est aussi possible que différents éléments contribuent à la régulation de la transcription d'un gène mais ne montrent pas d'activité individuelle quand ils sont artificiellement isolés les uns des autres dans une construction transgénique. Pour tester cette hypothèse, nous avons regroupé deux régions « inactives » dans une même construction. L' « association » des deux régions Endyl1 et Endyl3 n'améliore pas significativement leur activité, car même si on note une légère exaltation du marquage, l'expression ne dépend pas de Svb (figure 25). Toutefois, pour un autre gène cible de Svb, *forked (f)*, nous montrons que l'association de deux régions inactives quand elles sont testées individuellement, Enf4 et Enf5, permet de révéler un effet clair de



<u>Figure 26 :</u> Expression des CRMs EnF4, EnF5 et EnF45.
Le CRM EnF4 montre une activité transcriptionnelle faible et dépendante de Svb dans les trois compartiments, alors que cette même région ne montrait aucune activité avec le promoteur de *Hsp70*. La région EnF5 ne montre elle aucune activité régulatrice. Par contre, la combinaison des deux séquences EnF45 permet de diriger une expression reproduisant celle du gène *f* endogène, montrant qu'il existe une coopérativité entre ces deux régions génomiques.

coopérativité. L'association Enf4-5 montre une expression dans les cellules à trichomes robuste et dépendante de l'activité de Svb (figure 26). Ces résultats illustrent que la stratégie expérimentale retenue pour tester l'activité transcriptionnelle des régions prédites n'est pas neutre et présente de fait une influence significative sur la nature des résultats obtenus.

En conclusion, nos travaux amènent une connaissance nouvelle des mécanismes de contrôle de la transcription des gènes cibles de Svb au cours de la morphogenèse cellulaire dans l'épiderme embryonnaire. Si on note un enrichissement significatif dans l'occurrence du nombre de sites potentiels de liaison pour Svb dans ces gènes, nos analyses fonctionnelles montrent que l'activité *in vivo* de chacun de ces motifs ne peut être prédite simplement par son niveau de conservation évolutive. De plus, nous n'avons pas détecté de CRM basé sur le regroupement local de nombreux sites (clustering). En effet, les régions présentant une activité transcriptionnelle en réponse à Svb ne contiennent au mieux que 3 sites éloignés, dont l'influence individuelle reste cependant à déterminer. Dans le cas de *miniature*, il existe même un seul site de fixation à Svb dans chacun des deux CRM fonctionnels. Nos analyses prédisent qu'un élément potentiellement important est plutôt l'association hétérotypique avec le site Ovo d'autres motifs nucléotidiques, qui semble significative des CRM fonctionnels.

Concernant la nature des mécanismes du changement de l'organisation apicale des cellules épidermiques pour la formation des trichomes, nos résultats mettent en évidence que le facteur de transcription Svb active, probablement directement, l'expression de plusieurs gènes ZPD. Nous avons engagé ensuite l'analyse fonctionnelle systématique de famille ZPD chez la drosophile, pour mieux comprendre le rôle de la matrice extracellulaire apicale dans le changement localisé de la forme des cellules embryonnaires.

III. Les Protéines à domaine Zona Pellucida dans l’architecture de la denticule.

RESUME

Le domaine Zona Pellucida (ZP) définit une famille de protéines membranaires conservées au cours de l'évolution. Cependant le rôle de ces protéines au cours du développement reste encore mal caractérisé. Par une approche génétique chez la drosophile, nous montrons qu'un ensemble de huit protéines ZPD est nécessaire à la réorganisation localisée du compartiment apical au cours de la morphogenèse épidermique embryonnaire. Malgré la conservation structurale des domaines ZP, ces protéines possèdent des fonctions spécifiques dans le remodelage de la forme apicale des cellules épidermiques. En effet, la perte de fonction de l'une des protéines ZPD ne peut être compensée par la surexpression d'une autre. Chacune de ces protéines se localise dans des régions distinctes du domaine apical ne se recouvrant que très partiellement. De plus, l'absence d'une protéine ZPD entraîne un détachement localisé entre la membrane et la matrice extracellulaire apicale (aECM). Ainsi, chacune de ces protéines s'accumule dans une sous-région distincte du compartiment apical, où elle va organiser des interactions entre la membrane apicale et l'aECM. Nous montrons que cet échafaudage de protéines ZPD est nécessaire pour sculpter la forme des extensions cellulaires et maintenir l'intégrité apicale des cellules qui vont les former.

Les protéines ZPD révèlent une sous-compartimentalisation fonctionnelle de la membrane apicale, nécessaire au contrôle du changement de la forme des cellules épithéliales au cours du développement.

*Manuscript
Click here to view linked References

Zona Pellucida Domain proteins remodel the apical compartment for localized cell shape changes

Isabelle FERNANDES[1,3,*], Hélène CHANUT-DELALANDE[1,3,*], Pierre FERRER[1,3], Yvan LATAPIE[1,3], Lucas WALTZER[1,3], Markus AFFOLTER[2], François PAYRE[1,3,#] and Serge PLAZA[1,3,#]

[1] Université de Toulouse, UPS; Centre de Biologie du Développement; F-31062, Toulouse, France

[2] Biozentrum der Universität Basel, 4056 Basel, Switzerland.

[3] CNRS, UMR5547, Centre de Biologie du Développement, F-31062, Toulouse, France

* These authors contributed equally to the work

Corresponding authors: plaza@cict.fr, payre@cict.fr

Running title: ZPD proteins in morphological differentiation

Abstract

The Zona Pellucida Domain (ZPD) defines a conserved family of membrane-anchored matrix proteins that are as yet poorly characterized with respect to their functions during development. Using genetic approaches in flies, we show here that a set of 8 ZPD proteins is required for the localized reorganization of embryonic epidermal cells during morphogenesis. Despite varying degrees of sequence conservation, these ZPD proteins exert specific and non-redundant functions in the remodeling of epidermal cell shape. Each one accumulates in a restricted sub-region of the apical compartment, where it organizes local interactions between the membrane and the extracellular matrix. In addition, ZPD proteins are required to sculpture the actin-rich cell extensions and maintain appropriate organization of the apical compartment. These results on ZPD proteins therefore reveal a functional sub-compartmentalization of the apical membrane and its role in the polarized control of epithelial cell shape during development.

Introduction

Recent studies have demonstrated the importance of variations in the apical area of epithelial cells for the morphogenesis of different tissues (Lecuit and Lenne, 2007). However, the mechanisms by which terminal differentiation produces highly-ordered Threedimensional structures within the apical compartment remains poorly understood. In many cases, specific membrane extensions are required for the function of epithelial cells, and human diseases, such as deafness or retinal disorders, are linked to improper morphological differentiation of corresponding cells. Deciphering the dynamic networks that remodel the shape of epithelial cells is thus a prerequisite to understanding normal morphogenesis of animal cells, as well as various pathological states.

A primary step for the localized remodeling of epithelial cells is their polarization along the apical-basal axis. According to current models (Wodarz and Nathke, 2007), three main processes interact to modify the basic cellular mechanisms and lead to the polarized distribution of various molecules (Mellman and Nelson, 2008). First, post-translational control of protein sorting and intracellular trafficking provides intrinsic cues for the localized delivery of membrane components. Second, together with the cytoskeleton, protein complexes act as polarity determinants to provide orientation cues that specify overall cell polarity and shape (Wodarz and Nathke, 2007). Finally, extracellular cues are required to orientate intracellular mechanisms into a topologically ordered 3-dimensional space (Schock and Perrimon, 2002). It is well documented that adhesion, both between cells and between cells and the basal extracellular matrix (ECM), provides extrinsic information for changes in cell shape. In striking contrast, little is known about a putative influence of the apical ECM on the control of epithelial cell organization.

Drosophila embryonic epidermal cells are highly polarized and secrete proteins and polysaccharides that form a prominent apical ECM (aECM), cuticle, which protects the

animal against the external milieu (Locke, 2001; Payre, 2004). The epidermis is composed of a monolayer of cells that adopt two distinct morphologies: i) smooth cells and, ii) cells producing actin-rich apical extensions, called denticles in the ventral region and hairs in the dorsal region (collectively referred to as trichomes). The pattern of trichomes is stereotyped in *Drosophila melanogaster* and displays a wide range of evolutionary diversification between insect species (Delon and Payre, 2004). Results both from developmental and evolutionary studies have shown the importance of the gene *shavenbaby* (*svb*) in determining the trichome pattern (Delon and Payre, 2004; McGregor et al., 2007; Payre et al., 1999; Sucena et al., 2003). The control regions of *svb* integrate multiple inputs, emanating from signaling and positional information, to define the subset of cells forming trichomes in a given species (Delon and Payre, 2004; McGregor et al., 2007; Payre et al., 1999). *Svb* encodes a transcription factor that acts in a cell-autonomous manner to trigger trichome formation (Andrews et al., 2000; Delon et al., 2003) and identification of *svb* downstream targets has provided an unbiased means of discovering direct effectors of epidermal cell remodeling. Svb triggers the expression of regulators of general machineries, such as the ARP2/3 nucleation complex, for the localized polymerization and organization of actin filaments (Chanut-Delalande et al., 2006). More unexpectedly, Svb controls the expression of cuticle proteins (Andrew and Baker, 2008) and enzymes that increase trichome pigmentation and hardness (Chanut-Delalande et al., 2006). Furthermore, Svb directly controls the transcription of *miniature*, a gene encoding a membrane-anchored extracellular protein required for correct morphogenesis of trichome cells (Chanut-Delalande et al., 2006). These data thus suggest that the morphological differentiation of epidermal cells requires an intimate interaction between polarized actin cytoskeleton and aECM components.

Miniature belongs to a conserved family of aECM proteins, initially identified in the Zona Pellucida coat surrounding mammalian oocytes (reviewed by (Jovine et al., 2005)). These proteins are characterized by an extracellular motif of 260 aa, the ZP domain (ZPD), whose structure includes a conserved array of disulfide bridges. The ZPD is thought to act as a polymerization module, promoting the formation of homo- or hetero-typic filaments (Jovine et al., 2002). Indeed, the function of ZPD containing proteins often relies on polymers composed of distinct members of this family. In vertebrates, the hetero–association of ZP1, 2 and 3 in the Zona Pellucida coat and that of α and β-tectorin in the tectorial membrane is required for their function, *i.e.*, fertilization and hearing, respectively (Jovine et al., 2005; Verhoeven et al., 1998). In flies, genetic data also support a concerted action of *piopio* and *dumpy* during tracheal development (Jazwinska et al., 2003) and *miniature* and *dusky* during wing development (Roch et al., 2003).

To explore a possible contribution of multiple ZPD proteins to epidermal morphogenesis, we analyzed the entire ZPD gene family in *Drosophila*. We show that eight ZPD genes are co-expressed in denticle cells, under the transcriptional control of Shavenbaby. Individual ZPD proteins accumulate in separate regions along the cell extension, revealing a sub-compartmentalization of the apical region. Ultrastructural analyses show that the lack of each ZPD protein induces specific defects in membrane/aECM interactions, in corresponding apical sub-regions. These results reveal the existence of an ordered assemblage of distinct ZPD proteins, linking the aECM to actin organization and polarity complexes in order to remodel the apical region of epidermal cells.

Results

Diverse sub-types of Zona Pellucida proteins are co-expressed in the epidermis

The *Drosophila* genome encodes 16 proteins with a full-length ZP domain and other characteristics of ZPD proteins (Jazwinska and Affolter, 2004), *i.e.*, a peptide signal, a single-pass transmembrane domain and a short C-terminal cytoplasmic tail (Fig. 1A). Phylogenetic analyses suggest early separation of most extant *Drosophila* ZPD proteins and underline the existence of additional extracellular domains (Fig. 1A). For instance, Dumpy, a giant protein that contains 256 EGF motifs, six ZPD proteins contain 2-4 repeats of the PlAsminogen N terminus (PAN) domain, a cysteine-rich motif involved in protein interactions (Tordai et al., 1999). Although PAN or ZPD are found separately in various animal proteins, the combination of these two motifs in the same protein was not detected in vertebrates (Fig. S1). In contrast, we identified PAN-ZPD proteins in arthropods and nematodes, suggesting that they may be specific to ecdysozoan species. In mammals, the number of disulfide bridges defines two sub-types of ZPD domains, possibly related to different functions, with 10 cysteines in ZP1/2 and 8 cysteines in ZP3 (Jovine et al., 2005) (Fig. 1B). Both ZP1/2- and ZP3-like ZP domains are found in *Drosophila* proteins, associated with, or independent of, PAN domains (Fig. 1A,B).

The fact that ZPD proteins generally act within heterotypic polymers suggests that additional ZPD proteins contribute together with Miniature to epidermis differentiation. To explore this hypothesis, we systematically analyzed the expression of ZPD genes in trichome cells. Of the ZPD genes expressed in epidermal derivatives (Jazwinska and Affolter, 2004), we found that seven were co-expressed with *m* in trichome cells. We named these putative components of the matrix after characters of the eponymous movie (see Fig. 1A). The patterns of expression of *trynity (tyn), neyo (neo), morfeyus (mey), nyobe (nyo),* and *dusky-like (dyl)* strikingly resembled that of *m* (Fig. 1C). Double-staining

experiments confirmed that all six ZPD genes were co-expressed in trichome cells, in coinciding time-windows (see below). Each of these genes appeared to be transcribed in all trichome cells, with no detectable difference in expression levels. Two additional ZPD genes displayed overlapping but distinct transcription patterns. *zye* expression started later and was detected only in trichome cells of the ventral region (Fig. 1C). *cypher (cyr)* displayed a dynamic pattern of expression in trichome cells: *cyr* mRNA was first restricted to dorsal cells (Fig. 1C), then it shut down dorsally and was eventually detected only in ventral cells (not shown). As the expression of these ZPD genes strikingly matches the trichome pattern that is specified by *svb*, we examined their dependence on *svb* activity. We found that epidermal expression of each of the 8 ZPD genes was abolished or severely reduced in *svb* mutant embryos (Fig. 1C). Hence, these results show that *svb* controls the expression of a large and diverse subfamily of ZPD genes in trichome cells.

Each ZPD protein exerts a specific function in denticle cells.

The co-regulation of ZPD genes in trichome cells suggests that they act with *m* in the formation of apical extensions. To investigate the putative role of ZPD genes in epidermal morphogenesis, we analyzed the consequences of their inactivation.

Notwithstanding morphological features specific to each row, all wild-type denticles share a common organization: a large base, followed by a median constriction supporting the distal hook, which points anteriorly or posteriorly (Fig. 2A). We used strong hypomorph alleles of *m*, *tyn* or *zye* and generated small deficiencies deleting each of the *neo*, *nyo*, *mey*, *tyn*, *zye* and *dyl* genes (Fig. S2). In all ZPD mutants examined, each denticle row was present, but the denticles themselves displayed an altered morphology (Fig. 2A). Re-expression of M, Dyl, Tyn, Neo, Nyo and Zye in respective mutants restored wild-type denticle shape (Fig. 2 & S3). This indicates that denticles defects result from the lack of

each ZPD protein; a weak effect of neighboring genes that are also affected in some deficiencies (Fig. S2) can not be formally ruled out. In the absence of M, denticles were small and lacked the median constriction, adopting an abnormal triangular shape (Fig. 2A). *dyl* mutants were characterized by very small, unhooked denticles, often with a split extremity. Inactivation of *tyn* led to denticles with a flattened base and thin extensions, pointing perpendicularly to the apical surface. The denticles of *zye* mutants were thin and often twisted or broken. While inactivation of *neo* did not affect the overall morphology of denticles, it did lead to a marked decrease in their size. Similarly, *nyo* and *mey* mutants displayed smaller denticles, without other obvious morphological defects.

We then analyzed embryos carrying combinations of mutations (Fig. 2A). The phenotype of *m, tyn* double mutants was "aggravated" compared to each single mutant. Denticles displayed both the thin extremity found in *tyn* and the lack of medial constriction characteristic of *m* mutants. The additional inactivation of *zye* had a further effect, leading to denticles with a twisted appearance (Fig. 2A). The phenotype resulting from the cumulated inactivation of *m*, *tyn* and *zye* therefore suggests additive defects. The simultaneous inactivation of *neo, mey* and *nyo* caused defects similar to individual mutations, suggesting that these proteins probably act together during denticle formation.

These data establish that denticle formation relies on the coordinated action of seven genes encoding ZPD proteins. Furthermore, the phenotypical diversity observed between mutants suggests that these proteins are involved in separate functions.

The functional specificity of ZPD proteins relies on multiple protein regions.

To further test the functional separation of epidermal ZPD proteins, we devised an *in vivo* rescue assay, based on Gal4/UAS system that provides comparable temporal and quantitative expression of tested products. We focused on M and Tyn, representative

members of the two main sub-classes of ZPD in *Drosophila, i.e.,* proteins with only a ZPD and those containing both ZPD and PAN extracellular motifs (Fig. 1A).

Re-expression of M under these conditions was sufficient to rescue the denticle defects observed in *m* mutant embryos (Fig. 2B). It also rescued the strong reduction in size of adult wings, the phenotype at the origin of the name *miniature* (Morgan and Bridges, 1916). In addition to denticle defects in embryos, the absence of *tyn* leads to lethality at later stages. Re-expression of Tyn fully rescued *tyn* mutant defects in embryos and also restored adult viability (Fig. 2B). In contrast, M over-expression was not able to suppress *tyn* phenotypes, with respect neither to denticles nor to viability. Reciprocally, Tyn failed to rescue *m* phenotypes. We then assayed the rescuing ability of Dyl and Zye that like M lacks PAN domains, as well as Neo and Nyo, two close epidermal relatives of Tyn (see Fig. 1A). Expression of Dyl slightly modified the denticle phenotype of *m* embryos but did not rescue adult wings, and did not improve *tyn* mutant phenotypes. Zye was also unable to compensate for the absence of *m* or *tyn*. Neo and Nyo, which comprise three PAN domains, partially restored the viability of *tyn* mutants, without however significantly rescuing denticles (Fig. 2B). Therefore, the absence of a given ZPD protein cannot be efficiently compensated for by over-expressing a different ZPD protein, further demonstrating that they play non-redundant roles.

The fact that M and Tyn have distinct functions in the same cells offers an attractive opportunity to delineate *in vivo* the protein regions involved in their specificity. Using this genetic assay, we first tested the influence of the most prominent divergence between M and Tyn proteins, *i.e.,* the presence of PAN domains in Tyn (Fig. 3A). Deletion of PAN domains (Tyn-[ΔPAN]) severely impaired Tyn activity, leading only to a slight modification of the denticle phenotype and no restoration of the viability of *tyn* mutants. In addition, Tyn-[ΔPAN] was incapable of compensating for the absence of M. Reciprocally, the

insertion of Tyn PAN domains within M (M-[PAN-Tyn]) resulted in a protein unable to rescue *tyn* mutants, whereas this chimerical protein retained full *m* function (Fig. 3A). Thus, PAN domains are necessary for the function of Tyn, but they are not sufficient to confer *tyn* activity when added to the M protein. To test a putative contribution of the ZPD to the specificity of M and Tyn, we swapped their ZP domains (Fig. 3A). Replacement of the ZPD of M by that of Tyn (M-[ZPTyn]) resulted in a protein with a reduced capacity to rescue *m* defects. However, a weak effect on the denticle phenotype of *tyn* mutants suggested that this chimera had gained some Tyn activity. In the same vein, replacing the ZPD of Tyn by that of M (Tyn-[ZPM]) provided a significant rescue of *m* loss of function in adults, albeit without rescue of denticle defects in embryos.

We further explored function of the ZP domain within the Miniature protein. The determination of a ZP domain structure has recently shown the critical role of a conserved tyrosine residue for proper folding (Monne et al., 2008). A mutation substituting this tyrosine by a cysteine in human α-Tectorin (TECTA) provokes dominant genetic deafness (Verhoeven et al., 1998) and its introduction into mZP3 alters its polymerization properties (Monne et al., 2008). We generated transgenic lines encoding an Y117C mutated Miniature protein (M^{tecta}) (Fig. 3B) and found that M^{tecta} was unable to rescue, even partially, the phenotypes resulting from absence of M (Fig. 3C). Furthermore, increasing levels of M^{tecta} in a wild-type background progressively leads to dominant epidermal cell shape defects, in both embryos and adults (Fig. 3C).

Taken together, these data establish that, despite a varying degree of conservation, the different ZPD proteins co-expressed in denticle cells fulfill separate genetic functions. Functional specification of Miniature versus Trynity during evolution has relied on the divergence of multiple protein regions, including the addition of PAN domains, modification of the ZP domain itself and other sequences. Finally, a mutation shown *in vitro* to affect

polymerization properties of the ZP domain leads to a dominant behavior *in vivo*, further suggesting that function of epidermal ZPD proteins in *Drosophila* involves homo and/or heterotypic interactions.

ZPD proteins locally organize the contacts between the apical membrane and ECM. Having shown that several ZPD proteins play non redundant roles in denticle formation, we then explored their cellular functions during the remodeling of epidermal cell shape.

As a first step, we analyzed the sub-cellular distribution of ZPD proteins during denticle formation using non cross reacting antibodies raised against M, Tyn, Dyl and Zye (see Materials and Methods). M protein was first detected at the apical surface, where after it rapidly accumulated in a restricted apical region at the base of extensions (Chanut-Delalande et al., 2006). M finally became predominantly localized in the medial region of the denticle (Fig. 4A), although it did not extend to the basal-most zone or to the tip of extensions. We generated a transgenic construct encoding a fully active Miniature-HRP fusion protein (Fig. S3), whose HRP activity allows direct detection by electron microscopy (Dubois et al., 2001). Confirming results from confocal analysis, M-HRP was seen to localize in denticles and accumulate in the medial region of extensions (Fig. 4B). In addition, M-HRP was found associated with the aECM in the protein-rich layers of cuticle (Fig. 4B). These data thus suggest that Miniature specifically modifies the local composition of the aECM surrounding the extension of the apical membrane.

While the Dyl protein appeared concomitantly with M, the apical accumulation of Tyn and Zye was slightly delayed. Similarly to M, Dyl, Tyn and Zye were concentrated in restricted apical regions in the vicinity of growing denticles. However, Dyl was restricted to the tip of actin filaments, whereas Tyn and Zye accumulated only at the base of extensions (Fig. 4A). Double staining confirmed that ZPD proteins were present in

overlapping, but distinct, apical regions (Fig. 4C). From the tip of the extension to the base of the apical compartment, first Dyl, then M, and, more basally, Zye and Tyn accumulated.

All together, these data therefore show that each ZPD protein is targeted to a specific apical region, revealing successive sub-domains within the apical compartment of denticle cells.

ZPD proteins impinge on the apical organization of epithelial cells

To pursue the question of how ZPD proteins participate in the remodeling of the apical region, we undertook ultrastructural analyses of the organization of the membrane/aECM compartment.

The apical surface of smooth cells organizes actin-rich microvilli (Locke, 2001) or *undulae* (Moussian et al., 2007), which contact the cuticle only at their tips. In contrast, there is a continuous tight interaction between the plasma membrane and cuticle in denticles of wild-type embryos (Fig. 5a-a"). Lack of *m* disturbed this stereotyped organization, with impaired contacts between the denticle membrane and cuticle layers (Fig. 5b-b"). The absence of Dyl caused more severe defects, although again restricted to the denticle. The denticle cuticle appeared as a hollow structure, with the cell membrane lying at the bottom of the extension (Fig. 5c-c"). Since we did not detect abnormalities in the formation of actin bundles at earlier stages (Fig. S4), this suggests that Dyl is required to anchor the cell membrane to the tip of the denticles. Lack of Zye also resulted in apparent abnormal gaps between the membrane and cuticle layers, generally restricted to the base of the extension (Fig. 5d-d"). Finally, the absence of Tyn caused very basal defects in membrane/cuticle interactions (Fig. 5e-e").

TEM analysis suggested that the lack of Tyn and Zye disturbed the apical organization of denticle cells. Staining for apical determinants (Crumbs), or components of

Zonula Adherens junctions (DE-cadherin), revealed that denticle cells have a smaller apical area than smooth cells in wild-type (Fig. 6a). Whereas smooth cells display a cuboidal contour, denticle cells are also markedly elongated along the dorso-ventral axis (Fig. 6a,e). Inactivation of *tyn* or *zye* altered these typical features, leading to an enlargement of the apical surface of denticle cells, without affecting smooth cells (Fig. 6). Moreover, the intensity of Crumbs staining in wild-type was significantly higher in denticle cells than in smooth cells. We noticed a similar increase in levels of DE-Cadherin (Shg) within the junctions of wild-type denticle cells (Fig. 6a,e). The lack of *tyn* or *zye* prevented this build-up of apical complexes, which were reduced to (and often below) levels normally observed in smooth cells (Fig. 6b,f and c,g). In contrast, septate junctions appeared unaffected in ZPD mutants, as deduced from normal ultrastructure and distribution of Dlg or Fas3 in such embryos (Fig. 6i-l).

In sum, these data show that the different ZPD proteins are required to establish and/or maintain localized membrane/aECM contacts within restricted areas of the apical compartment. This includes the stabilization of high levels of apical protein complexes, likely to be involved in the remodeling of epidermal cells to promote the formation of apical extensions.

Discussion

Zona Pellucida Domain (ZPD) proteins organize various ECM known to play important roles in adults, since mutations in ZPD genes cause infertility, deafness or renal and vascular disorders (Jovine et al., 2005). However, our understanding of how ZPD proteins contribute to the development of embryonic tissues remains limited. Through the systematic analysis of *Drosophila* ZPD genes, we show here that a diverse subfamily of ZPD proteins contributes to remodeling the shape of embryonic epidermal cells during their differentiation. We find that each ZPD protein accumulates in, and thereby defines, a restricted apical sub-region to locally modify the composition of aECM and its interaction with membrane domains.

Transcriptional control of epidermal morphogenesis

The *Drosophila* embryonic epidermis provides a well understood framework within which to address the mechanisms of changes in cell shape during development (Schock and Perrimon, 2002). The polarity of epidermal cells is progressively established throughout the period of tissue differentiation (Muller and Bossinger, 2003) and hormones subsequently control cuticle deposition (Locke, 2001; Payre, 2004). Before this, regulatory cascades define the subpopulations of cells that undergo apical shape remodeling through the control of *svb* expression (McGregor et al., 2007; Payre et al., 1999). Svb, in turn, triggers the expression of numerous factors that modify actin, membrane and ECM organization. Svb directly controls the expression of the ZPD gene *m* (Chanut-Delalande et al., 2006) and we show here that *m* encodes a protein addressed to the extracellular space of the cell, where it will become integrated within cuticle layers.

By means of a systematic analysis of the genomic set of ZPD genes in flies, we find that Svb actually promotes the expression of eight ZPD genes in the precise sub-

population of epidermal cells that form trichomes. Epidermal expression of these ZPD genes generally starts at stage-14, peaks at stage-15 and becomes progressively down-regulated from stage-16. This time-window correlates with two major events of epidermal differentiation, *i.e.,* the first sign of apical shape remodeling and the onset of cuticle deposition (Moussian et al., 2006). While *m, dyl, nyo, neo, mey* and *tyn* are transcribed in all trichome cells, *cyr* and *zye* are differentially expressed between ventral and dorsal trichome cells. We recently identified an additional ZPD gene (CG12814) in the *Drosophila* genome and observed that *svb* triggers its expression, like that of *cyr* and *zye*, in restricted dorso/ventral subsets of trichome cells (Fig. S5). This raises the possibility that ZPD proteins contribute to the differential shaping of trichomes observed between different cell populations. However, ZPD genes are unlikely to play a role in the row-specific shaping of denticles, because we did not detect obvious differences in their expression within each denticle belt. As shown in the case of *m* (Chanut-Delalande et al., 2006), it is possible that Svb directly controls the expression of other ZPD genes in trichome cells. Consistent with this hypothesis, genomic analysis of sequenced *Drosophilidae* species predicts the existence of conserved Ovo/Svb binding sites in non-coding regions of these novel *svb* downstream genes (Stark et al., 2007).

Evolutionary diversification of ZPD gene functions

That Svb co-regulates a set of 8 closely related ZPD genes may indicate that the latter correspond to a recent evolutionary expansion and, consequently, still retain redundant functions. For example, several ZPD genes co-expressed in hypodermal cells of *C. elegans* embryos play at least partially redundant roles in cuticle differentiation (Muriel et al., 2003; Sapio et al., 2005; Sebastiano et al., 1991). However, several lines of evidence show that this is not the case for *Drosophila* ZPD in trichome cells. First, the individual

inactivation of ZPD genes leads to characteristic denticle defects. The absence of a given ZPD gene results in a specific alteration of the denticle shape that is recognizable in both individual and combined ZPD mutants. For example, the cumulated inactivation of *m*, *tyn* and *zye* results in highly misshapen denticles, which we interpret as the additive consequences of the lack of each ZPD gene. Second, most ZPD genes diverged more than 150 my ago, since their putative ortholog can be traced back in beetles, mosquitoes and bees (Fig. S6 and data not shown). The only exceptions are *neo*, *nyo* and *mey,* which probably arose from recent gene duplication in *Drosophilidae* (Fig. S6). Although their absence leads to a similar small-denticle phenotype, these three genes are unlikely to retain fully redundant functions in denticle formation since their simultaneous inactivation does not increase the observed defects. Finally, our rescue experiments provide unambiguous evidence that the lack of a given ZPD gene cannot be efficiently compensated for by the over-expression of a different ZPD gene, thus demonstrating that each ZPD protein possesses a separate function for localized shaping of trichome cells.

Insights into the functional specificity of ZPD proteins

One important question is therefore what determines the specific function of a given ZPD protein? Current models suggest a major role of the ZPD itself in the functional diversification of ZPD proteins (Wassarman, 2008). Besides the conservation of a restricted structural backbone that involves invariant cysteines, the ZPD has been the object of rapid sequence evolution (Fig. 3B and S7). It has been proposed that the N-terminal half of ZPD (ZP-N) acts as a polymerization module (Jovine et al., 2006; Monne et al., 2008), while the C-terminal half (which allows alternative disulfide bond connectivity) may be a primary determinant of specificity. Our *in vivo* analyses support that the importance of the ZP-N is widely conserved throughout species, as a Y>C mutation

originally identified in human TECTA (Verhoeven et al., 1998) compromises function of the *Drosophila* Miniature protein. Furthermore, mutated M^{tecta} exerts a dominant effect when expressed in wild-type animals, suggesting that, like *in vitro* (Monne et al., 2008), this substitution within the ZPD N-term affects the polymerization properties of ZPD proteins. The ZP domain also influences the specificity of ZPD proteins, since replacing the ZP domain of Trynity by that of Miniature is sufficient to confer partial rescue of *m* defects *in vivo*. However, the reverse substitution does not compensate for the loss of Trynity activity, which critically relies on the presence of PAN domains. In addition, the region C-terminal to the ZP domain also contributes to ZPD protein specificity and, accordingly, it is strongly conserved between insect orthologs (Fig. S8). In the same vein, mZP3 exon7, a region located downstream the ZP domain, is responsible for mZP3 protein specificity (Litscher et al, 2009). Our results thus show that the functional specificity of epidermal ZPD in flies is determined by multiple protein regions and not solely by the ZP domain. Extrinsic factors may also modulate the functions of ZPD proteins, since they are known to be extensively modified with N- and O-linked oligosaccharides (Jovine et al., 2005). Interestingly, several O-glycosylation enzymes are expressed in subsets of epidermal cells in *Drosophila* embryos (Tian and Ten Hagen, 2007), where they possibly regulate the activity of ZPD proteins.

Epidermal ZPD proteins control polarized changes in cell shape

ZPD proteins localize to distinct apical sub-regions of epidermal cells, in correlation with the local defects observed when a given protein is missing (Fig. 7). Dyl accumulates at the tip of denticles, which are split in *dyl* mutants. M is enriched in the medial region of extensions and *m* mutants lose the medial constriction characteristic of normal denticles. *tyn* and *zye* mutations affect the base of denticles, where the respective proteins normally

accumulate. Ultrastructural analyses further show that defects in denticle shaping imply local alteration of aECM and plasma membrane, suggesting that ZPD proteins are required to organize extracellular components (and possibly their interaction with membrane), specifically in denticles. This is consistent with recent results suggesting that cuticle formation relies on highly organized protein secretion at specific locations within the apical plasma membrane (Moussian et al., 2007). Our data show that the local composition of the aECM does indeed display distinct ZPD-mediated modifications. We speculate that a heterogeneous scaffold of ZPD proteins is necessary to induce and/or organize the local forces necessary for the correct shaping of denticles (Fig. 7). A parallel can be drawn with data suggesting a mechanical role for ZPD proteins in the local remodeling of cell shape in other systems, such as elongation of pupal wing cells in *Drosophila* (Roch et al., 2003), constriction of lateral hypodermal cells in *C. elegans* (Sapio et al., 2005) and induction of columnar shape in kidney and ES cells (Takito and Al-Awqati, 2004). The Zona Pellucida coat also influences the embryonic-extraembryonic axis of the mammalian blastocyst through physical constraints (Kurotaki et al., 2007), showing that ZPD proteins may be involved at multiple steps in the mechanical regulation of cell and tissue shape.

ZPD proteins and the polarized organization of epidermal cells.

The concentric distribution of ZPD proteins within the apical membrane of epidermal cells reveals a previously overlooked sub-compartmentalization of the apical domain. How are these apical sub-compartments defined and how do they interact with other determinants of cell polarity? It is possible that intrinsic properties of ZPD proteins contribute to the construction of a highly ordered scaffold that organizes the apical membrane around the cell extension. Supporting this hypothesis, we observed, for example, a mislocalization of

Dyl protein in *m* mutants (IF, unpublished results). Although our genetic data are compatible with the existence of homo and/or heterotypic interactions between epidermal ZPD proteins, extensive test of their polymerisation properties now awaits biochemical characterization, a challenging task due to the high level of post-translational modifications of this family of extracellular matrix proteins.

The distribution of a given ZPD protein must also rely on extrinsic factors, such as regulators of trafficking machineries and future cellular analyses will be required to address this important issue. Routing ZPD proteins to apical sub-regions likely requires as well a proper apico/basal polarization. Unexpectedly, the most basal ZPD proteins, Tyn and Zye, are required for correct maintenance of junctional complexes and apical determinants in denticle cells. This, in turn, suggests a bidirectional interaction between ZPD proteins and junction/polarity complexes to ensure, on the one hand, proper localisation of ZPD and, on the other hand, a reinforcement of junctions and apical determinants in denticle cells. Reorganization of cell junctions is critical for various changes in cell shape, such as those involved during germ band extension or mesoderm invagination (Lecuit and Lenne, 2007), and it may be involved in the stretching that occurs along the DV axis of denticle cells. In addition, deformation of the apical compartment that is mediated by actin and ECM reorganization probably requires a robust architecture of lateral structures to be translated into a coherent change in cell shape. Interestingly, Piopio and Dumpy ZPD proteins are also required for junction remodelling during trachea formation (Jazwinska et al., 2003). Likewise, the ZPD protein Hensin/DMBT1 influences cell polarity and promotes the formation of junctional complexes (Takito and Al-Awqati, 2004), a finding that may be relevant to its deletion in various cancers (Al-Awqati, 2008).

In conclusion, these data show that local modifications of the apical ECM provide additional cues that influence the polarized organization of epithelial cells and are required for their morphogenesis. The specific distribution and function of ZPD proteins open novel directions to explore how trafficking machineries are specified for protein delivery to apical sub-domains, in intimate interaction with localized actin remodelling and fine tuning of polarity determinants and cell-cell junctions.

Materials and Methods

Fly strains

UAS-m, UAS-tyn, UAS-dyl, UAS-neo, UAS-tyn[ΔPAN], UAS-m[PAN-tyn], UAS-m[ZPtyn], UAS-tyn[ZPm], UAS-mHRP and UAS-m^{tecta} transgenic lines were generated using P-element transformation. Unless specified, other stocks were obtained from the Bloomington stock centre: m^{1}, tyn^{PG38} (P[GawB]SP71^{PG38}, (Bourbon et al., 2002)), $zye^{EY05938}$ (P[EPgy2]^{EY05938}), svb^{1}, svb^{1},btd^{1}, *da*-GAL4. We generated null alleles for *tyn* and *zye* and induced the following small deficiencies Δdyl^{26}, Δneo^{36}, Δnyo^{32}, Δmey^{13}; Δ*nyo-mey* using the procedure described in (Parks et al., 2004) (see Fig. S2). A strain that combined Δ*nyo-mey* and Δneo^{36} was obtained by meiotic recombination. Each stock was confirmed by molecular characterization and mutant chromosomes were kept over balancers carrying Kr-Gal4; UAS-GFP transgenes.

Molecular procedures

UAS-constructs are pUAST derivatives generated from cDNAs for *m, tyn*, *dyl*, *neo*, *nyo*, and *cyr* (DGRC consortium) or using PCR amplified ORF from BAC-R02B14 for *zye*. Plasmids encoding modified ZPD proteins and HRP fusions were generated using PCR and QuikChange XL site-directed mutagenesis (Stratagene). All constructs were verified by sequencing see supplementary data for detailed procedures.

Antibody production and staining

DNA fragments corresponding to protein regions: S_{266}-T_{358} for Tyn, and P_{354}-G_{497} for Dyl were cloned into pGEX6p1 and GST-fusion proteins, purified according to the manufacturer's specification (GE-Care), were used for immunizing rats and rabbits (Agrobio). For Zye, rabbits were immunized with the synthetic peptide

EFDDSSPRLTRDTSLC (Eurogentec) and antibodies were affinity-purified. In each case, antibody specificity was attested by the lack of signal observed in embryos lacking the corresponding protein. Staining was performed according to (Chanut-Delalande et al., 2006), with anti-M (Roch et al., 2003) at 1/200, anti-Dyl at 1/300, anti-Tyn at 1/300, anti-Zye 1/20, α-crb (Cq4, 1/500), α-Shg (DCAD2, 1/50), α-Dlg (4F3, 1/100) (the latter three from DSHB, Iowa), Alexafluor-488 or Alexafluor-546 secondary antibodies at 1/1000 (Molecular Probes) and TRITC-phalloidin (Sigma). Embryos were imaged with a Leica TSP2 confocal microscope.

***In situ* hybridization**

Dig- or biotin-labeled antisense RNA probes were synthesized from cDNA or genomic fragments and used for *in situ* hybridization experiments, as described previously (Chanut-Delalande et al., 2006). Fluorescent *in situ* hybridizations were processed using TSA™ following the manufacturer's specification (Molecular Probe).

Electron microscopy

Live mutant embryos were hand-selected under a stereomicroscope equipped for epifluorescence. Stage-16 embryos were fixed for 15 min in heptane saturated with glutaraldehyde, hand devitellinized, washed in water and dehydrated through ethanol series. Following critical-point drying (CPD750 Emscope), they were sputtered with a 2.9 nm platinum coat (JEOL JFC2300HR) and examined with a JEOL JSM6700F scanning electron microscope. For transmission electron microscopy, embryos were fixed and devitellinized as above and, for M-HRP detection, were stained in DAB solution. Following post-fixation for 1 h in 1% osmium tetroxide and dehydration, samples were embedded in

Epon. Sections were stained with uranyl acetate and photographed with a JEOL 2100CRP200 keV.

Acknowledgements

We are grateful to the Bloomington Drosophila Stock Center, Developmental Studies Hybridoma Bank and Drosophila Genomic Resource Center for providing us with flies, antibodies and molecular clones. We are indebted to A. Leru, B. Ronsin, S. Balor and N. Benmeradi (Toulouse RIO Imaging), M. Düggelin and U. Sauder (Zentrum Mikroskopie der Universität Basel), I. Fourquaux and B. Payre (CMEAB), S. Leblond (TEMSCAN) for their help with microscopy and to P. Valenti for excellent technical assistance. We also thank J. Smith and A. Vincent for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the “Association pour la Recherche contre le Cancer” (n° 3832, n° 1111 and a fellowship to I.F.) and the “Fondation pour la Recherche Médicale (programme équipe 2005)”. The authors declare no conflict of interest. IF, HCD, FP and SP conceived and designed the experiments. IF, HCD, YL, PF and SP performed the experiments and are listed according to their respective contributions. IF, HCD, PF, SP and FP wrote the paper. LW and MA contributed reagents and analytical tools.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Structure and expression of *Drosophila* ZPD proteins

A. Phylogenetic tree grouping *Drosophila* ZPD proteins according to the conservation of their ZP domain (pink rectangle). 7 proteins comprise additional motifs in the extracellular region, such as EGF (green pentagon) or PAN (green & grey boxes) repeats. Signal peptides are drawn in orange and trans-membrane domains in blue.

B. Patterns of conserved Cys in the ZP domain define two subgroups of *Drosophila* proteins, which like mammalian ZP1/2 and ZP3 contain 10 and 8 residues, respectively.

C. mRNA expression of *miniature (m), dusky-like (dyl), morpheyus (mey), nyobe (nyo), trynity (tyn), neyo (neo), cypher (cyr)* at stage-15 and *zye* at stage-16. Whole mounts show *in situ* hybridization in wild-type embryos. Note the expression of *zye* only in the ventral region (arrowhead). *Cyr* mRNA is restricted to dorsal cells at stage-15 (open arrowhead) then switches to ventral stripes at stage-16/17. Close-up of ZPD expression in A3-4 abdominal segments in wild-type (*wt*) and *shavenbaby (svb)* mutant embryos. All views are of ventral cells, except for *cyr* pictures, showing latero-dorsal cells.

Figure 2: ZPD mutant display specific defects in epidermal cell shape.

A. Electron micrographs of denticles (4th row of the A4 segment). When compared to wild type, embryos mutant for any ZPD gene, *i.e.*, m^1, $dyl^{\Delta 126}$, zye^{ex72}, tyn^{PG38}, $neo^{\Delta 32}$, $nyo^{\Delta 33}$, or $mey^{\Delta 13}$ display specific alterations of denticle shape. Embryos carrying simultaneous mutations for m^1, tyn^{PG38} and m^1, tyn^{PG38} & zye^{ex72} exhibit additive denticle phenotypes, while the combination of $neo^{\Delta 32}$ and *nyo, mey* mutations leads to a phenotype similar to that of single mutant. Scale bar: 500 nm. **B.** Ability of UAS-cDNA constructs to rescue m^1 and tyn^{PG38} mutant phenotypes, as assayed in embryos (denticles) and adults (wing size

or viability, respectively), when expressed using the *da*-GAL4 driver. (+++) corresponds to a full rescue of denticle defects, (+) indicates very partial phenotypical amelioration and (+/-) a slight modification of the denticle phenotype that cannot unambiguously be interpreted as rescuing towards wild-type. Levels of wing size were calculated from 100% rescue (wild-type size) to 0% (size of m^1 mutant wings).

Figure 3: Functional specificity of ZPD proteins

A. Rescuing activities of chimeric forms of Trynity and Miniature (shaded) proteins. The 3 Pan-AP domains have been deleted from the Tyn protein (Tyn[ΔPAN]), or inserted at a similar position within the Miniature protein (M[PAN-Tyn]). M[ZPTyn] and Tyn[ZPM] correspond to a reciprocal exchange of the two ZP domains. **B**. Structure-based alignment of the ZP-N region of *Drosophila* M, Tyn, Nyo, Mey, Neo, Cyr, Dyl and Zye proteins, as well as mouse Zona Pellucida 3 (mZP3). Black boxes indicate conserved Cys residues and lines presumptive disulfide bonds. The tyrosine residue corresponding to that substituted in human α-tectorin (Y1850C) is boxed in pink. In the Miniature protein, the introduced mutation is Y117C (M^{tecta}).

C. Activity of M^{tecta} protein assayed in embryos (denticles) and adults (wings). M^{tecta} expression was driven by *da*-GAL4 in m^1 mutants, or in wild-type animals. In the latter, dominant defects appeared when using two copies of UAS-m^{tecta} construct, and three copies gave clear defects in all examined specimen. Pictures show denticle organization in wild-type, m^1 mutant embryos and embryos expressing M^{tecta} in an otherwise wild-type context.

Figure 4: ZPD proteins localize in specific sub- apical domains.

A. Subcellular localization of M, Dyl, Tyn and Zye proteins in epidermal cells of stage-15 wild-type embryos (A3 or A4 segment). Actin filaments were stained by phalloidin (red) and ZPD proteins with mono-specific antibodies (green). Close-ups highlight the distinct localization of ZPD proteins along the extension. **B**. TEM analysis of M-HRP localization in stage-16 embryos. HRP activity leads to a dark stain revealing M-HRP accumulation within endocuticle layers of the denticle. Bar: 500 nm. **C.** Co-detection of Miniature (green) with either Dyl or Tyn (magenta), colocalization appears in white.

Figure 5: Ultra-structural analysis of denticle defects in *m, dyl, tyn* and *zye* mutants.

a-e, TEM micrographs of denticle cells from wild-type, m^{1}, tyn^{PG38}, $dyl^{\Delta 26}$ *and* $zye^{Ey05938}$ embryos. Inactivation of *m* alters membrane/aECM contact all around the extension (**b**), whereas tyn^{PG38} (**d**) and $zye^{EY05938}$ (**e**) alter the base of extensions down to cell junctions. $dyl^{\Delta 26}$ mutants lack cytoplasm in the extension (**c**). Scale bar: 500 nm. **a'-e'** close-ups of **a-e** pictures. **a"-e"** schematic representations of close-ups, with double black lines representing the epicuticle, light grey lines endocuticle and dark grey the cytoplasm. Pink, green and yellow correspond to the Marginal Zone (MZ, also referred to as Sup-Apical Region), Adherens Junctions (AJ) and Septate Junctions (SJ), respectively. Blue areas highlight regions where plasma membrane does not appear to contact cuticle layers, showing abnormal enlargement in ZPD mutants, at specific locations along the extension.

Figure 6: Disorganization of the apical compartment in *tyn* and *zye* mutants

Localization (green) of Crumbs (**a-d**), Shotgun (**e-h**), and Disc-large (**i-l**) proteins in *wt*, tyn^{PG38} and zye^{ex72} embryos. Apical extensions are visualized using anti-Dyl antibody (red) and magenta lines delimit denticle cells. **d**, **h** and **l** histograms represent the apparent area of denticle cells, as from Crb, Shg and Dlg staining. Note the increased area of denticle cells in *tyn* and *zye* mutants when compared to wild type (ratio 1.6 for *tyn/wt* and 1.9 for *zye/wt* using the Crb staining). Yellow lines outline the contour of one cell. Below confocal pictures, histograms plot the signal intensity. Crumbs levels are enhanced in *wt* denticle cells compared to naked cells (**a**), while signal intensity is similar in all epidermal cells in *tyn* and *zye* mutants (**b,c**). Shotgun is also enhanced in *wt* denticle cells (**e**), whilst diminished in *tyn* and *zye* mutants (**f,g**).

Figure 7: Model of ZPD protein function during apical cell shape remodeling

A: During epidermis differentiation, the apical surface is remodeled via a thrust of actin bundles, which triggers the formation of the apical extension (denticle) beginning at stage-14. At stage-15, the localized deposition and function of ZPD proteins cause the extension to shrink, thus sculpturing and stabilizing the shape of the denticle during and after actin bundle retraction.

B: In wild-type epidermal cells, belts, corresponding to aECM modifications mediated by each ZPD protein, shape the denticle. The loss of a given ZPD protein results in the local alteration of the aECM and/or its interaction with corresponding membrane sub-domain, resulting in a specific defect of the apical cell shape.

REFERENCES

Al-Awqati, Q. (2008). 2007 Homer W. Smith award: control of terminal differentiation in epithelia. J Am Soc Nephrol *19*, 443-449.

Andrew, D.J., and Baker, B.S. (2008). Expression of the Drosophila secreted cuticle protein 73 (dsc73) requires Shavenbaby. Dev Dyn *237*, 1198-1206.

Andrews, J., Garcia-Estefania, D., Delon, I., Lu, J., Mevel-Ninio, M., Spierer, A., Payre, F., Pauli, D., and Oliver, B. (2000). OVO transcription factors function antagonistically in the Drosophila female germline. Development *127*, 881-892.

Bourbon, H.M., Gonzy-Treboul, G., Peronnet, F., Alin, M.F., Ardourel, C., Benassayag, C., Cribbs, D., Deutsch, J., Ferrer, P., Haenlin, M., *et al.* (2002). A P-insertion screen identifying novel X-linked essential genes in Drosophila. Mech Dev *110*, 71-83.

Chanut-Delalande, H., Fernandes, I., Roch, F., Payre, F., and Plaza, S. (2006). Shavenbaby couples patterning to epidermal cell shape control. PLoS Biol *4*, e290.

Delon, I., Chanut-Delalande, H., and Payre, F. (2003). The Ovo/Shavenbaby transcription factor specifies actin remodelling during epidermal differentiation in Drosophila. Mech Dev *120*, 747-758.

Delon, I., and Payre, F. (2004). Evolution of larval morphology in flies: get in shape with shavenbaby. Trends Genet *20*, 305-313.

Dubois, L., Lecourtois, M., Alexandre, C., Hirst, E., and Vincent, J.P. (2001). Regulated endocytic routing modulates wingless signaling in Drosophila embryos. Cell *105*, 613-624.

Jazwinska, A., and Affolter, M. (2004). A family of genes encoding zona pellucida (ZP) domain proteins is expressed in various epithelial tissues during Drosophila embryogenesis. Gene Expr Patterns *4*, 413-421.

Jazwinska, A., Ribeiro, C., and Affolter, M. (2003). Epithelial tube morphogenesis during Drosophila tracheal development requires Piopio, a luminal ZP protein. Nat Cell Biol *5*, 895-901.

Jovine, L., Darie, C.C., Litscher, E.S., and Wassarman, P.M. (2005). Zona pellucida domain proteins. Annu Rev Biochem *74*, 83-114.

Jovine, L., Janssen, W.G., Litscher, E.S., and Wassarman, P.M. (2006). The PLAC1-homology region of the ZP domain is sufficient for protein polymerisation. BMC Biochem *7*, 11.

Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Litscher, E., and Wassarman, P.M. (2002). The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. Nat Cell Biol *4*, 457-461.

Kurotaki, Y., Hatta, K., Nakao, K., Nabeshima, Y., and Fujimori, T. (2007). Blastocyst axis is specified independently of early cell lineage but aligns with the ZP shape. Science *316*, 719-723.

Lecuit, T., and Lenne, P.F. (2007). Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol *8*, 633-644.

Litscher, E.S., Williams, Z., and Wassarman, P.M. (2009) Zona Pellucida Glycoprotein ZP3 and Fertilization in Mammals. Mol Reprod Dev *76*, 933-41.

Locke, M. (2001). The Wigglesworth Lecture: Insects for studying fundamental problems in biology. J Insect Physiol *47*, 495-507.

McGregor, A.P., Orgogozo, V., Delon, I., Zanet, J., Srinivasan, D.G., Payre, F., and Stern, D.L. (2007). Morphological evolution through multiple cis-regulatory mutations at a single gene. Nature *448*, 587-590.

Mellman, I., and Nelson, W.J. (2008). Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. Nat Rev Mol Cell Biol *9*, 833-845.

Monne, M., Han, L., Schwend, T., Burendahl, S., and Jovine, L. (2008). Crystal structure of the ZP-N domain of ZP3 reveals the core fold of animal egg coats. Nature *456*, 653-657.

Morgan, T.H., and Bridges, C.B. (1916). Sex-linked inheritance in Drosophila. Publs Carnegie Instn, 1-88.

Moussian, B., Seifarth, C., Muller, U., Berger, J., and Schwarz, H. (2006). Cuticle differentiation during Drosophila embryogenesis. Arthropod Struct Dev *35*, 137-152.

Moussian, B., Veerkamp, J., Muller, U., and Schwarz, H. (2007). Assembly of the Drosophila larval exoskeleton requires controlled secretion and shaping of the apical plasma membrane. Matrix Biol *26*, 337-347.

Muller, H.A., and Bossinger, O. (2003). Molecular networks controlling epithelial cell polarity in development. Mech Dev *120*, 1231-1256.

Muriel, J.M., Brannan, M., Taylor, K., Johnstone, I.L., Lithgow, G.J., and Tuckwell, D. (2003). M142.2 (cut-6), a novel Caenorhabditis elegans matrix gene important for dauer body shape. Dev Biol *260*, 339-351.

Parks, A.L., Cook, K.R., Belvin, M., Dompe, N.A., Fawcett, R., Huppert, K., Tan, L.R., Winter, C.G., Bogart, K.P., Deal, J.E., *et al.* (2004). Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the Drosophila melanogaster genome. Nat Genet *36*, 288-292.

Payre, F. (2004). Genetic control of epidermis differentiation in Drosophila. Int J Dev Biol *48*, 207-215.

Payre, F., Vincent, A., and Carreno, S. (1999). ovo/svb integrates Wingless and DER pathways to control epidermis differentiation. Nature *400*, 271-275.

Roch, F., Alonso, C.R., and Akam, M. (2003). Drosophila miniature and dusky encode ZP proteins required for cytoskeletal reorganisation during wing morphogenesis. J Cell Sci *116*, 1199-1207.

Sapio, M.R., Hilliard, M.A., Cermola, M., Favre, R., and Bazzicalupo, P. (2005). The Zona Pellucida domain containing proteins, CUT-1, CUT-3 and CUT-5, play essential roles in the development of the larval alae in Caenorhabditis elegans. Dev Biol *282*, 231-245.

Schock, F., and Perrimon, N. (2002). Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol *18*, 463-493.

Sebastiano, M., Lassandro, F., and Bazzicalupo, P. (1991). cut-1 a Caenorhabditis elegans gene coding for a dauer-specific noncollagenous component of the cuticle. Dev Biol *146*, 519-530.

Stark, A., Lin, M.F., Kheradpour, P., Pedersen, J.S., Parts, L., Carlson, J.W., Crosby, M.A., Rasmussen, M.D., Roy, S., Deoras, A.N., *et al.* (2007). Discovery of functional elements in 12 Drosophila genomes using evolutionary signatures. Nature *450*, 219-232.

Sucena, E., Delon, I., Jones, I., Payre, F., and Stern, D.L. (2003). Regulatory evolution of shavenbaby/ovo underlies multiple cases of morphological parallelism. Nature *424*, 935-938.

Takito, J., and Al-Awqati, Q. (2004). Conversion of ES cells to columnar epithelia by hensin and to squamous epithelia by laminin. J Cell Biol *166*, 1093-1102.

Tian, E., and Ten Hagen, K.G. (2007). O-linked glycan expression during Drosophila development. Glycobiology *17*, 820-827.

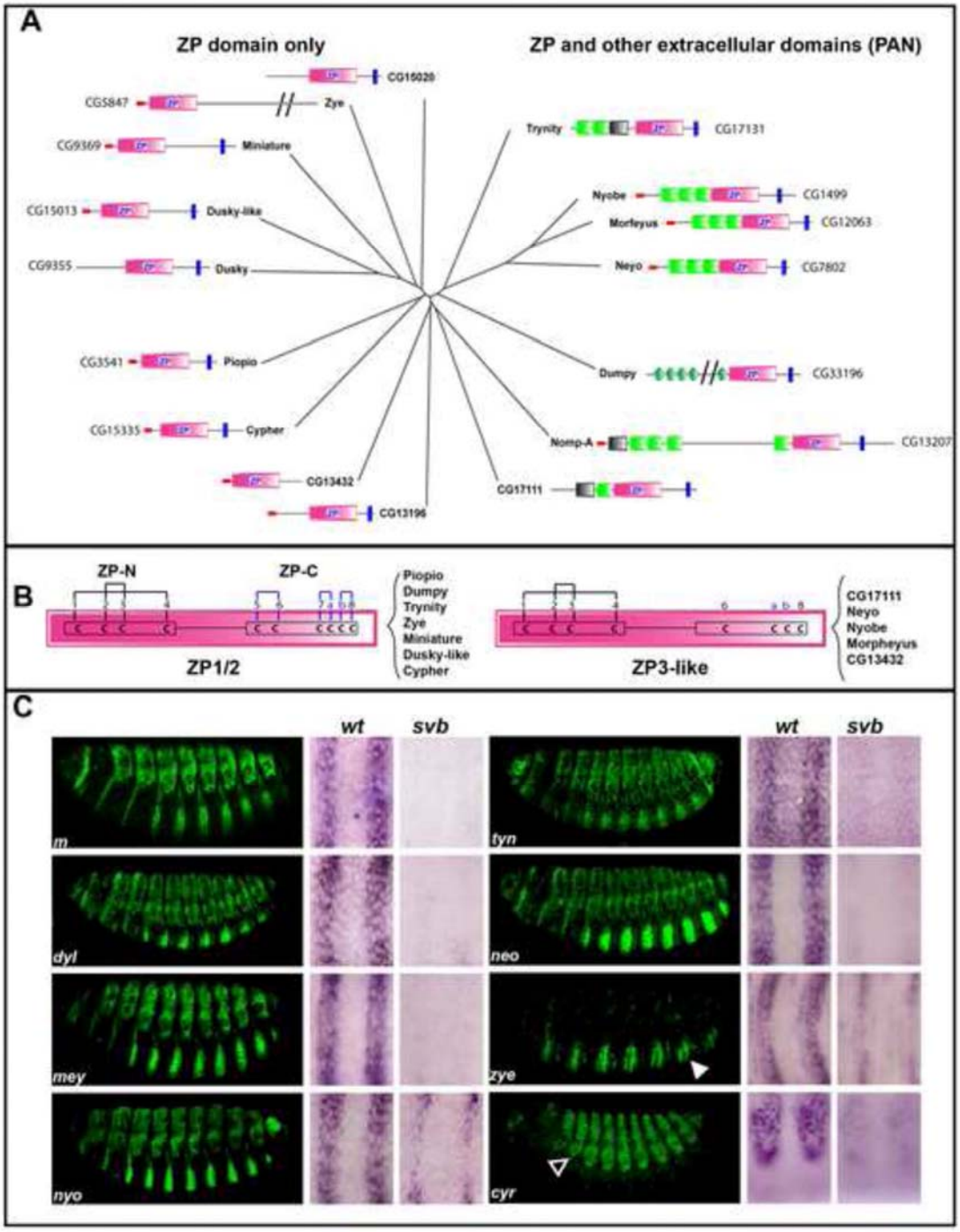
Tordai, H., Banyai, L., and Patthy, L. (1999). The PAN module: the N-terminal domains of plasminogen and hepatocyte growth factor are homologous with the apple domains of the prekallikrein family and with a novel domain found in numerous nematode proteins. FEBS Lett *461*, 63-67.

Verhoeven, K., Van Laer, L., Kirschhofer, K., Legan, P.K., Hughes, D.C., Schatteman, I., Verstreken, M., Van Hauwe, P., Coucke, P., Chen, A., *et al.* (1998). Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. Nat Genet *19*, 60-62.

Wassarman, P.M. (2008). Zona pellucida glycoproteins. J Biol Chem *283*, 24285-24289.

Wodarz, A., and Nathke, I. (2007). Cell polarity in development and cancer. Nat Cell Biol *9*, 1016-1024.

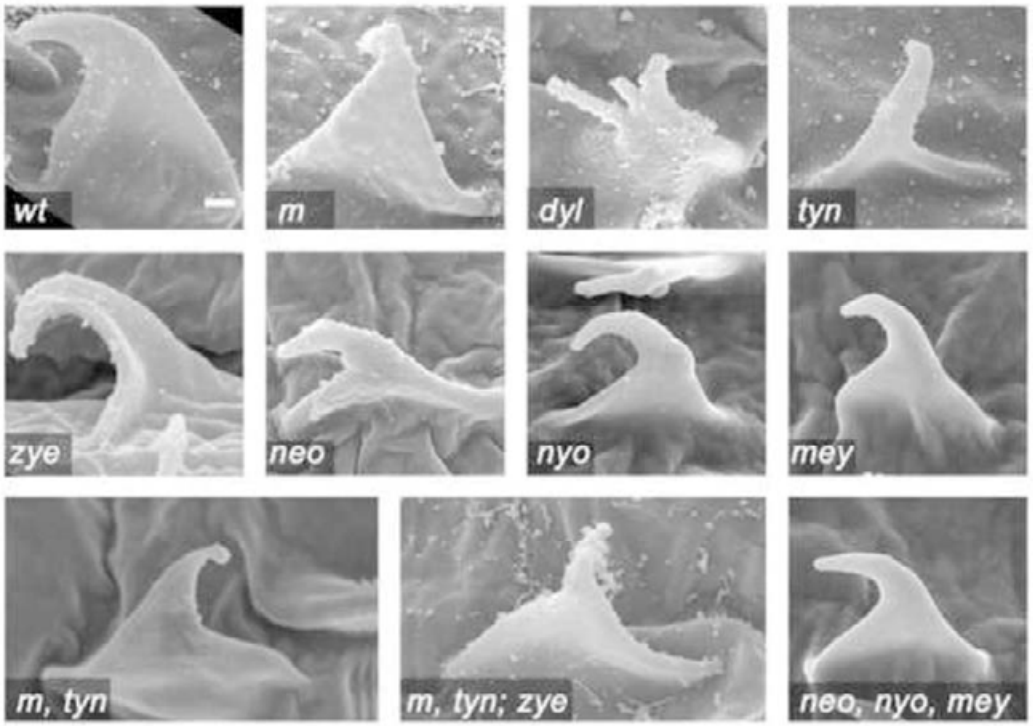
Figure1
Click here to download high resolution image



Fernandes et al, Figure 1

Figure2
Click here to download high resolution image

A

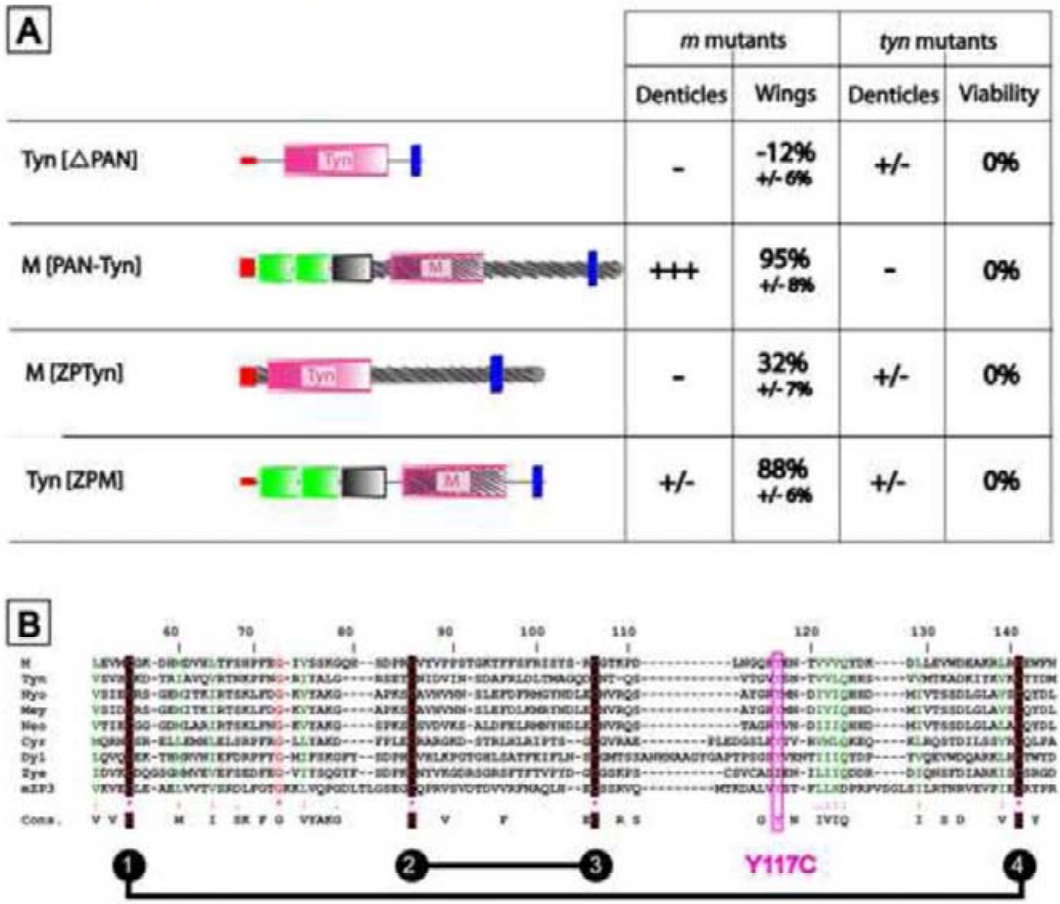


B

	m mutants		*tyn* mutants	
	Denticles	Wings	Denticles	Viability
UAS-*m*	+++	90% +/-7%	-	0%
UAS-*dyl*	+/-	10% +/-4%	-	0%
UAS-*tyn*	-	6% +/-5%	+++	80%
UAS-*neo*	-	3% +/-5%	+	13%
UAS-*nyo*	-	4% +/-4%	+	14%
UAS-*zye*	-	3% +/-5%	-	0%

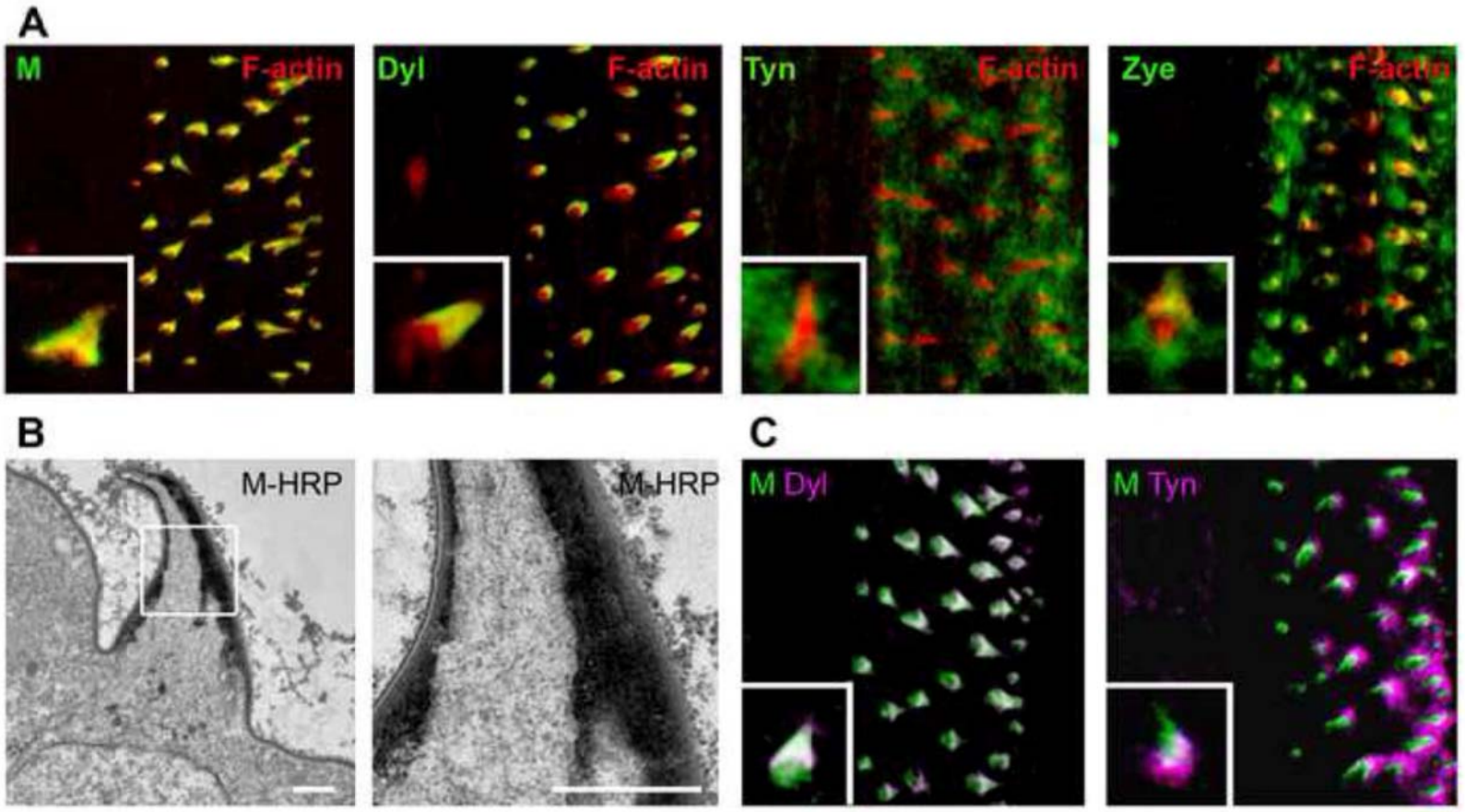
Fernandes et al, Figure 2

Figure3
Click here to download high resolution image



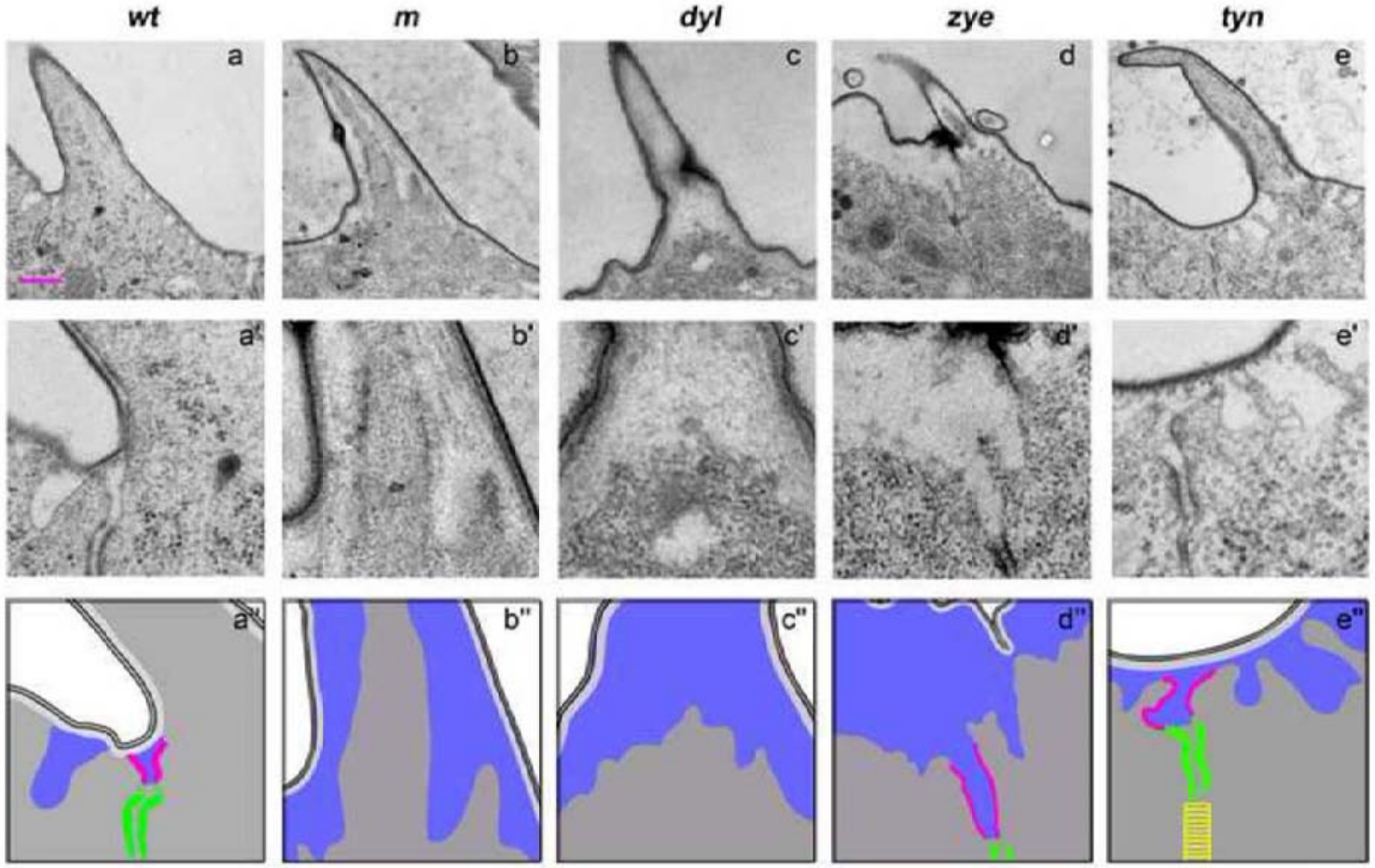
Fernandes et al, Figure 3

Figure4
Click here to download high resolution image



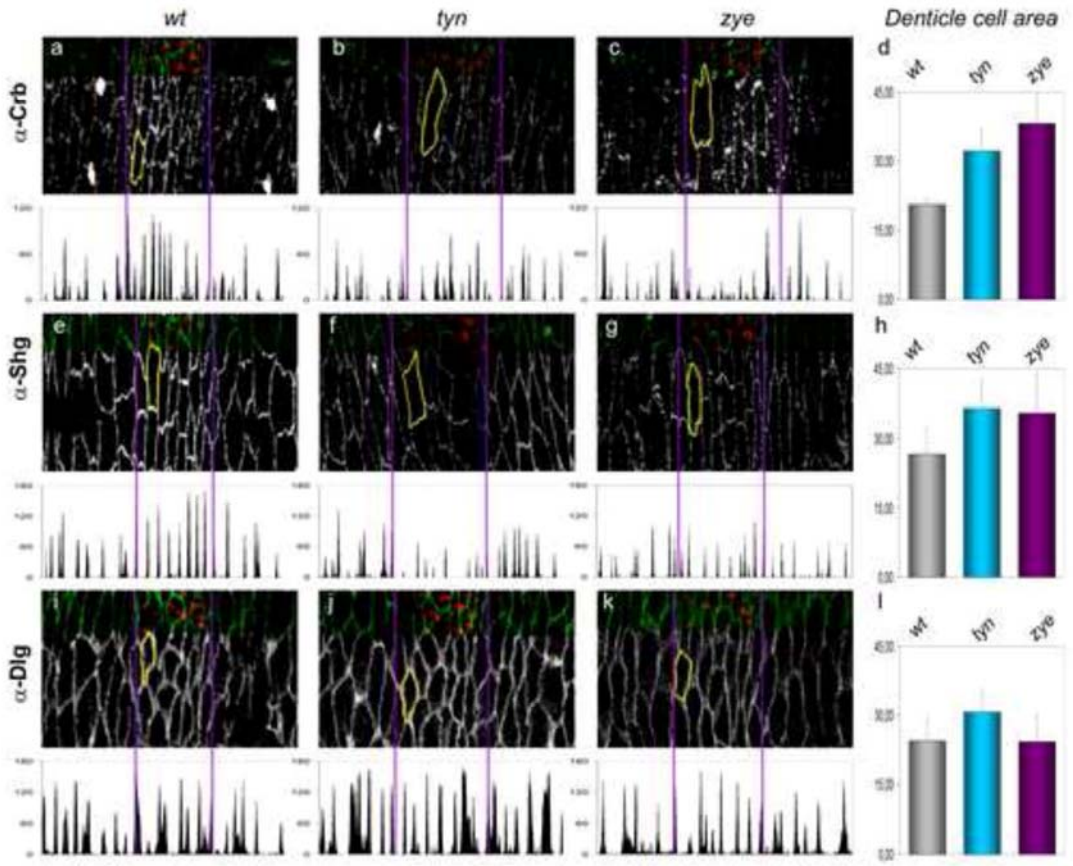
Fernandes et al, Figure 4

Figure5
Click here to download high resolution image



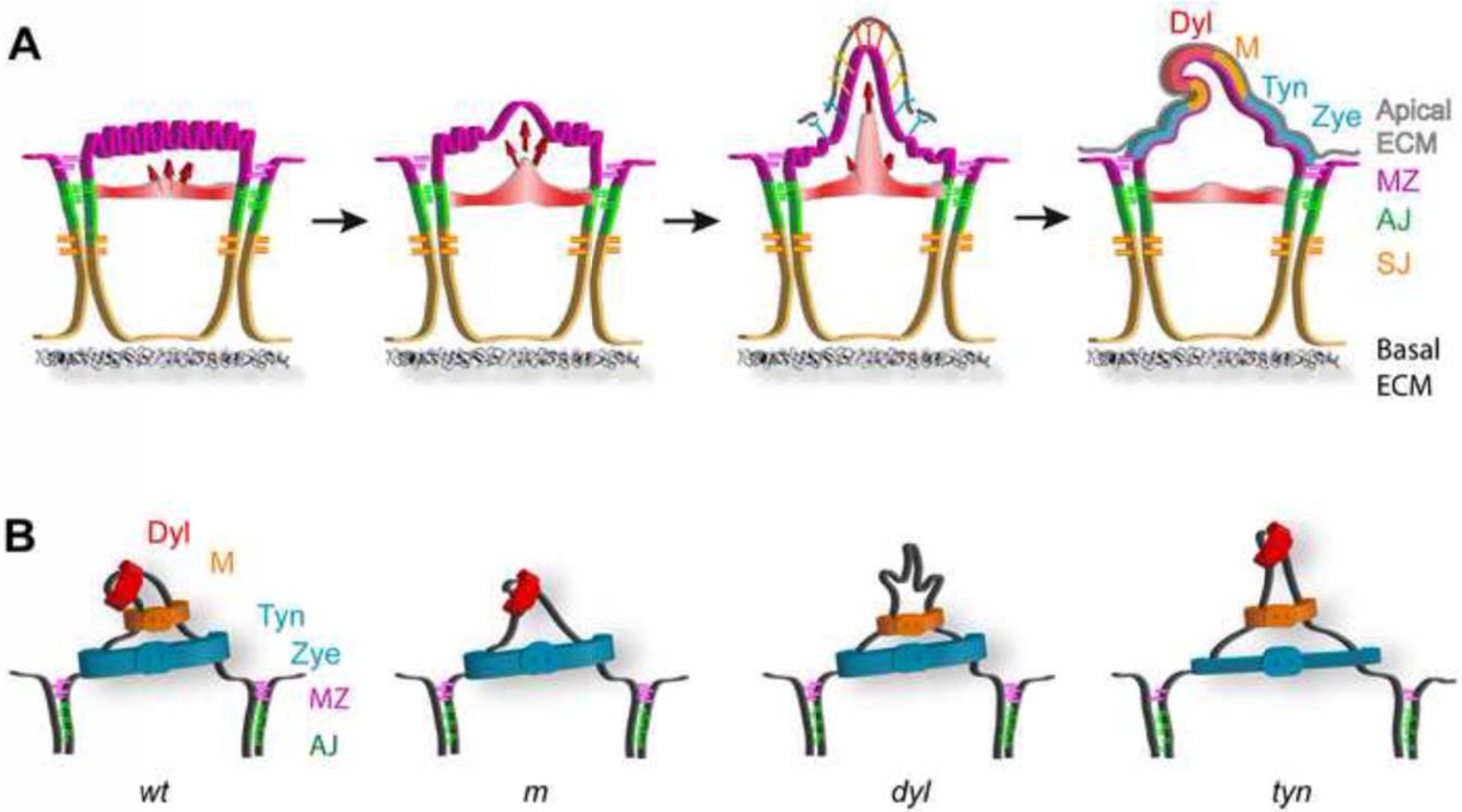
Fernandes et al, Figure 5

Figure6
Click here to download high resolution image



Fernandes et al, Figure 6

Figure7
Click here to download high resolution image



Supplementary material and methods

Molecular clones

cDNAs for *m* (RE53556), *tyn* (RE15579), *dyl* (LP05062), *neo* (GH22837), *nyo* (RE37929), and *cyr* (RE22259) were obtained from the Drosophila Genomics Resource Center (https://dgrc.cgb.indiana.edu/) and inserted into pUAST vector using Not1 and Acc65i restriction sites. The integrity of each cDNA was verified by complete sequencing, and in case of *dyl*, the wild-type sequence (according to the last genome release) was restored by site-directed mutagenesis to correct a frame shift mutation present in the full length cDNA clone. For *mey*, we did not succeed in obtaining a full-length and wild-type ORF, since all molecular clones we analyzed were corrupted at several locations. We did not obtain either a correct cDNA for *zye*, but in this case we could generate a mini-gene rescuing construct. *zye* ORF was PCR amplified from the BAC-R02B14 and subcloned into pUAST using the same cloning sites.

To generate deleted and chimerical proteins, the cDNA sequence encoding the ZP domain of *m* and *tyn* were deleted and replaced by a linker containing AvaI or NdeI restriction sites. These restriction sites were used to introduce another ZP domain, PCR amplified with the linker sites. Introduction of restriction sites and deletion of the 3 PanAP region in *tyn* were performed using QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit from Stratagene. PanAP domains or HRP sequence were amplified by PCR and inserted between the signal peptide and the ZP domain at NcoI in *m* cDNA. For HRP-tyn, a SmaI site was created in the *tyn* cDNA between the signal peptide and PanAP domains and used to insert the DNA fragment encoding full length HRP (from (Connolly et al., 1994)). m^{Tecta} was created by PCR directed mutagenesis: the Y117 codon U**A**U was converted into U**G**U, leading to Y117 C substitution in the M^{tecta} protein. All constructions were verified by sequencing using an Applied Biosystem ABI sequencer. Details of primers used are available upon request.

Deficiencies and ZPD mutants

The two P-elements insertions $P[GawB]SP71^{PG38}$ and $P[EPgy2]^{EY05938}$ were induced to jump out through crossing with a line carrying a source of Δ2-3 P-transposase. Precise P-element excisions resulted in both cases in the restoration of a wild type phenotype. Imprecise excisions were further characterized by southern blot and PCR. As indicated in Supp 2, Zye^{ex72} lacks the entire *Zye* coding region, whereas Tyn^{ex35} and Tyn^{ex92} delete part of the first *tyn* intron. We generated small deficiencies removing: *dyl*, *neo*, *mey*, *nyo* and *nyo+mey*, (Δdyl^{26}, Δneo^{36}, Δnyo^{32}, Δmey^{13}; Δnyo-*mey)* using the following lines (stock list description: f05707, f03405, e02047, f05431, e00001, f06996, f02800, f06024) obtained from EXELIXIS. Deficiencies were generated through FRT recombination (Parks et al., 2004) between PBac elements (Thibault et al., 2004) and characterized molecularly using the following primers: transposon-specific primers were according to (Parks et al., 2004) specific genomic primers were:

CG12063: 5'CAACAGCGACATCCAAAGAAC
and 5'TCAGATGACGATGCAAAAGGCGGAGTAAATAGC;
CG15013: 5'TGAACAGCAGCCAAGTTCAG
and CGGAGTGCCAGAGGATCTAC;

CG1499: 5'GTGACGAATGACCCTTGACC
and 5'GGTGGTATCCGTGATGCTGC;
CG7802: 5'CATCTATGGGCAGCTTGGACAGG
and 5'GCCTTCATAGCAGCTCTTGG.
In situ hybridization as well as immunostaining experiments confirmed the absence of gene expression in the respective mutants.

Rescue experiments
We constructed the following stocks by classical crosses using *Kr*-GAL4>>UAS-GFP (Casso et al., 2000) versions of FM7c and TM3,Sb^1 balancers (Bloomington Drosophila Stock Center, http://flystocks.bio.indiana.edu/): m^1/FM7; *da*-GAL4/TM3 and m^1/FM7; UAS-*m*/TM3 and tyn^{ex35}/FM7; *da*-GAL4/TM3 and tyn^{ex35}/FM7; UAS-*tyn*/TM3. Females m^1 /FM7-GFP; *da*-GAL4/TM3-GFP or tyn^{ex35}/FM7-GFP; *da*-GAL4/TM3-GFP were crossed by males of the following genotypes: FM7-GFP; UAS-*dyl*/TM3-GFP and FM7-GFP; UAS-*neo*/TM3-GFP and FM7-GFP; UAS-*nyo*/TM3-GFP and FM7; UAS-*Zye*/TM3-GFP and FM7; UAS-*Tyn*/TM3-GFP and FM7-GFP; UAS-*tyn[ΔPAN]*/TM3-GFP and FM7-GFP; UAS-*m[PAN-Tyn]*/TM3-GFP and FM7-GFP; UAS-*m[ZP-Tyn]*/TM3-GFP and FM7-GFP; UAS-*tyn[ZP-M]*/TM3-GFP and FM7-GFP; UAS-*M-HRP*/TM3-GFP and FM7-GFP; UAS-M^{tecta}/TM3-GFP. The percentage of viability was calculated from comparing numbers of males *tyn*; *da*-GAL4/UAS-cDNAxxx to that of their sibling sisters *tyn*/FM7; *da*-GAL4/UAS-cDNAxxx. For *mey,* the absence of available full length cDNA precluded to rescuing assays. On the other hand, we did not succeed in generating mutations that abolish *cyr* expression. For the genes *zye*, *dyl*, *neo*, *nyo* that are all located on the third chromosome, each deficiency was recombined with the appropriate UAS-cDNA or *da*-GAL4 construct and, after molecular validation of the meiotic recombinants, kept over TM3, *Kr*-GAL4>>GFP balancer. In theses cases, rescue experiments were performed according to the following cross: Df-xxx, UAS-xxx/TM3-GFP X Df-xxx, *da*-GAL4/TM3-GFP. Stocks were: Δdyl^{26}, UAS-dyl/TM3-GFP and Δdyl^{26}, *da*-GAL4/TM3-GFP and Δneo^{36},UAS-neo/TM3-GFP and Δneo^{36},*da*-GAL4/TM3-GFP and Δnyo^{32},UAS-Nyo/TM3-GFP and Δnyo^{32},*da*-GAL4/TM3-GFP. Mutant embryos carrying both UAS and GAL4 transgenic constructs were selected under a LEICA stereomicroscope equipped for epifluorescence and further processed for cuticle analysis.

Measurement of cell and wing size
Adult flies were stored in Glycerol/EtOH (1/1) for at least 24h, and then entire wings were dissected in the same medium. Dissected wings were rinsed 3 times in 100% EtOH, 2 times in EtOH/Lactic acid (5/6) and mounted between glass slide and coverslip in the same medium. Wing preparations were stored under gentle pressure for at least 48h before examination. Electronic pictures were processed using PhotoshopCS (Adobe) to delineate the contour of adult wings or embryonic cells. Size measurement was performed using the ImageJ software (http://rsb.info.nih.gov/ij/) and data processed using Excel data sheets. A minimum of 30 cells from at least 5 different embryos of the same genotype was used to estimate the mean size of embryonic epidermal cells. For adult wings, their size was estimated from measures done with 15-25 wings for each genotype.

Antibodies

The Cq4, DCAD2 and 4F3 antibodies developed respectively by E. Knust (Tepass et al., 1990), T. Uemura (Oda et al., 1994) and C. Goodman (Parnas et al., 2001) were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242. Embryo staining was performed following standard procedures, except fixative that was: NaIO4 12mM, NaOPO4 25mM pH=7,2, Lysine 15mM, 8% para-formaldehyde (EM grade, Bioscience).

References:

Casso, D., Ramirez-Weber, F., and Kornberg, T.B. (2000). GFP-tagged balancer chromosomes for Drosophila melanogaster. Mech Dev *91*, 451-454.

Connolly, C.N., Futter, C.E., Gibson, A., Hopkins, C.R., and Cutler, D.F. (1994). Transport into and out of the Golgi complex studied by transfecting cells with cDNAs encoding horseradish peroxidase. J Cell Biol *127*, 641-652.

Oda, H., Uemura, T., Harada, Y., Iwai, Y., and Takeichi, M. (1994). A Drosophila homolog of cadherin associated with armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion. Dev Biol *165*, 716-726.

Parks, A.L., Cook, K.R., Belvin, M., Dompe, N.A., Fawcett, R., Huppert, K., Tan, L.R., Winter, C.G., Bogart, K.P., Deal, J.E., *et al.* (2004). Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the Drosophila melanogaster genome. Nat Genet *36*, 288-292.

Parnas, D., Haghighi, A.P., Fetter, R.D., Kim, S.W., and Goodman, C.S. (2001). Regulation of postsynaptic structure and protein localization by the Rho-type guanine nucleotide exchange factor dPix. Neuron *32*, 415-424.

Tepass, U., Theres, C., and Knust, E. (1990). crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of Drosophila epithelial cells and required for organization of epithelia. Cell *61*, 787-799.

Thibault, S.T., Singer, M.A., Miyazaki, W.Y., Milash, B., Dompe, N.A., Singh, C.M., Buchholz, R., Demsky, M., Fawcett, R., Francis-Lang, H.L., *et al.* (2004). A complementary transposon tool kit for Drosophila melanogaster using P and piggyBac. Nat Genet *36*, 283-287.

Organisms	ZP domains (complete)	PAN domains	ZP + PAN domains
S. cerevisiae	**0**	**0**	**0**
C. intestinalis	**41**	**4**	**0**
C. elegans	**45**	**25**	**7**
T. castaneum	**12**	**4**	**4**
A. gambiae	**15**	**4**	**3**
D. melanogaster	**17**	**7**	**6**
T. nigroviridis	**37**	**8**	**0**
G. gallus	**20**	**4**	**0**
H. sapiens	**17**	**9**	**0**
A. thaliana	**0**	**39**	**0**

Figure S1: Evolutionary repartition of proteins containing PAN and/or ZP domains

Several annotated genomes were searched for genes encoding proteins containing a complete (8 or 10 conserved cysteines) Zona-Pellucida domain, or Apple/PAN (PAN) domains or both (ZP + PAN). Numbers correspond to the total number of genes in a given genome that encode a protein comprising a single motif or combination of those. Ensembl database (yeast, Ciona, Tetraodon, chick, human), wormbase (*Caenorhabditis*), beetlebase (*Tribolium*), vectorbase (*Anopheles*), flybase (*Drosophila*) and Tair (*Arabidopsis*) have been screened through Ensembl, Smart or Interpro tools for PFAM domains PF00100 and PF0024.

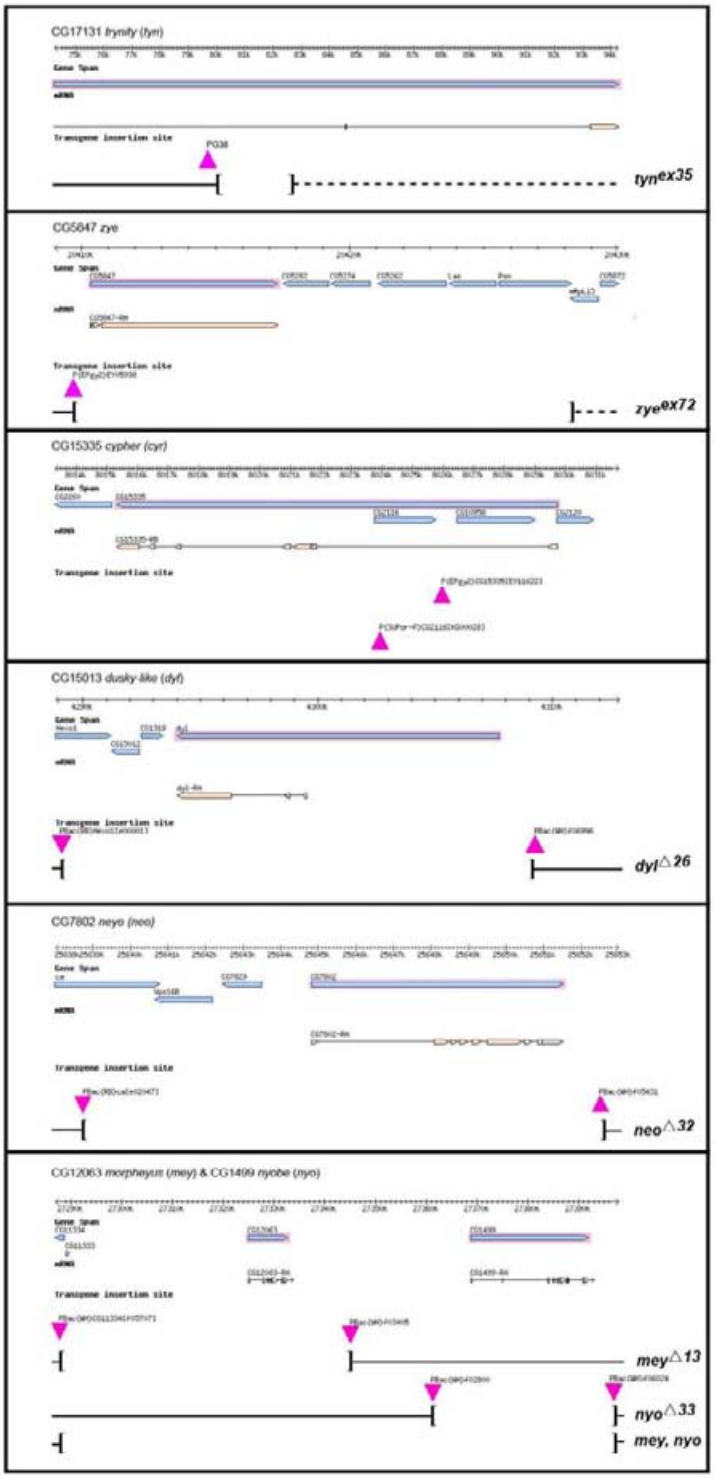


Figure S2: Maps of deletions generated at the various ZP loci.
PG38 (Bourbon et al., 2002) was used to generate P element excisions. Imprecise excisions of the P{EPgy2}EY05938 (flybase) were generated to obtain a complete deletion of the *CG5847/zye* gene. PBac elements were obtained from Exelixis(https://drosophila.med.harvard.edu/) and used to generate small deficiencies deleting *dyl*, *neo*, *nyo*, *mey* and *mey+nyo* through FRT-mediated site specific recombination following procedures described in Parks et al., (2004).

Figure S3: Rescue of ZPD mutant phenotypes

Mutant	UAS-construct	Rescue (*)
m^{1}	UAS-Miniature	+++
m^{1}	UAS-Miniature-HRP	+++
tyn^{PG38}	UAS-Trynity	+++
Δdyl^{26}	UAS-Dusky-like	+++
Δneo^{36}	UAS-Neyo	++
Δnyo^{32}	UAS-Nyobe	+++
zye^{ex72}	UAS-Zye	+++
Δmey^{13}	not available	nd

(*): Rescuing abilities of the various UAS-cDNA constructs were assayed in all cases with respects of denticles formation and, in the case of *m* and *tyn*, also tested for adult phenotypes, *i.e.*, wing size and viability respectively. Most Δneo^{36}, *da*-GAL4 /Δneo^{36}, UAS-*neyo* displayed wild-type denticles, but we noticed a small proportion of embryos with denticles defects we interpret as being neomorphic, since unlike those of Δneo^{36} embryos they are of normal size but often mis-orientated, presumably resulting from ectopic levels of *neyo* expression.

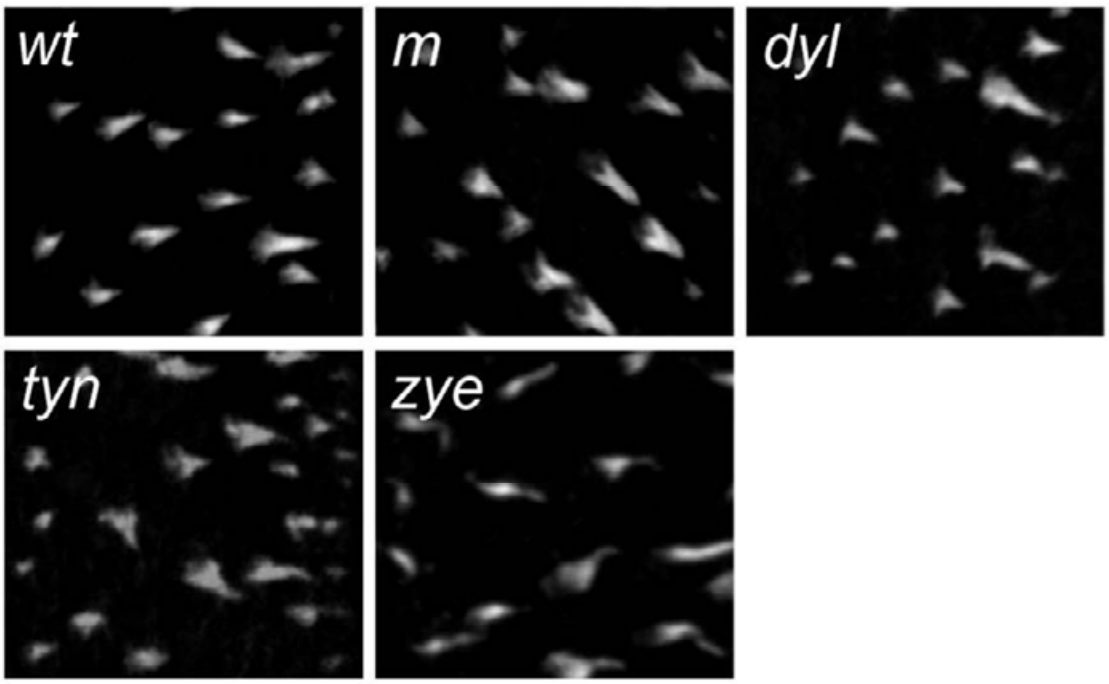


Figure S4: F-Actin organization in apical extensions of epidermal cells.
Stage-15 embryos were stained with fluorescent-phalloidin that reveals the distribution of actin filaments, at the apical surface of wild-type cells or lacking *miniature*, *dusky-like*, *trynity* or *zye*. Whereas modifications of the shape of actin-rich cells extensions are visible in the different mutant contexts, the lack of any ZPD protein does not prevent the formation of apical actin-bundles.

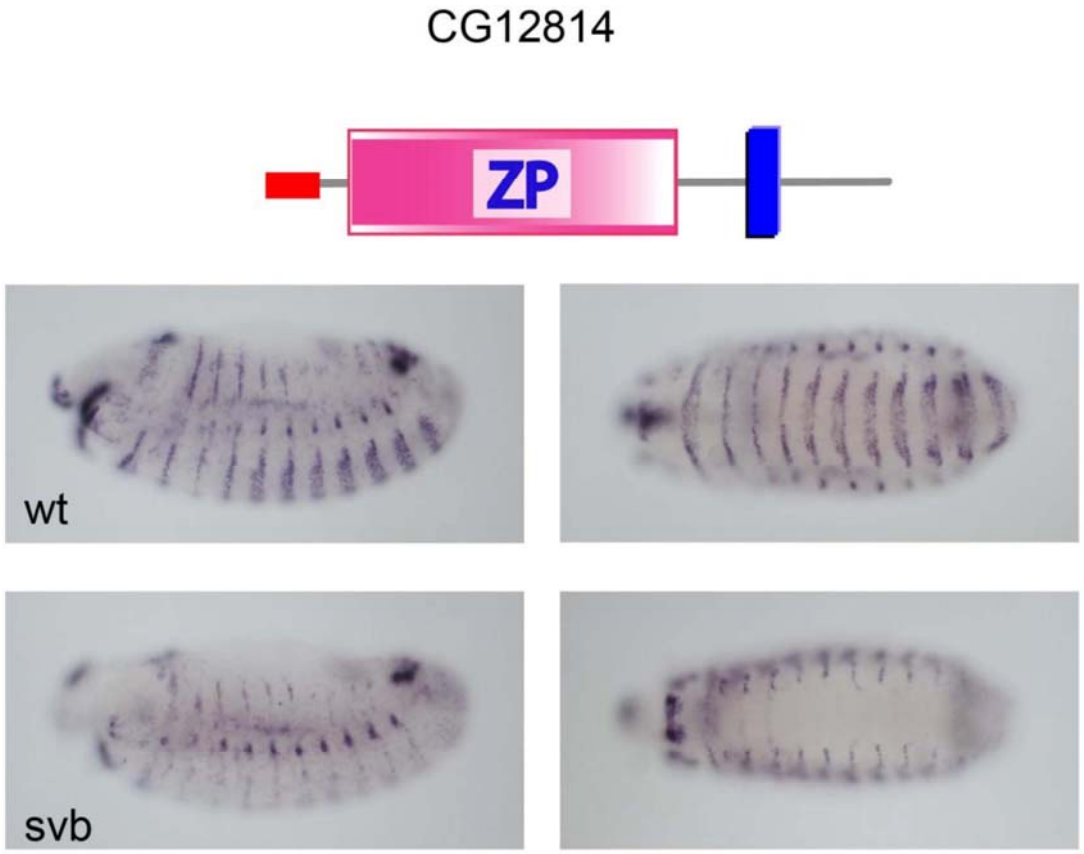


Figure S5: Structure of the ZPD protein encoded by CG12814 and its expression during embryogenesis
An additional ZPD gene has been uncovered in the genome release 2006. Top: schematic structure of the protein. Bottom: *In situ* hybridization revealed a striped expression in subsets of epidermal cells, which depends on *svb* activity. Lateral (left) and ventral (right) views of stage-14 embryos. Top pictures are wild-type embryos, bottom *svb* mutant embryos.

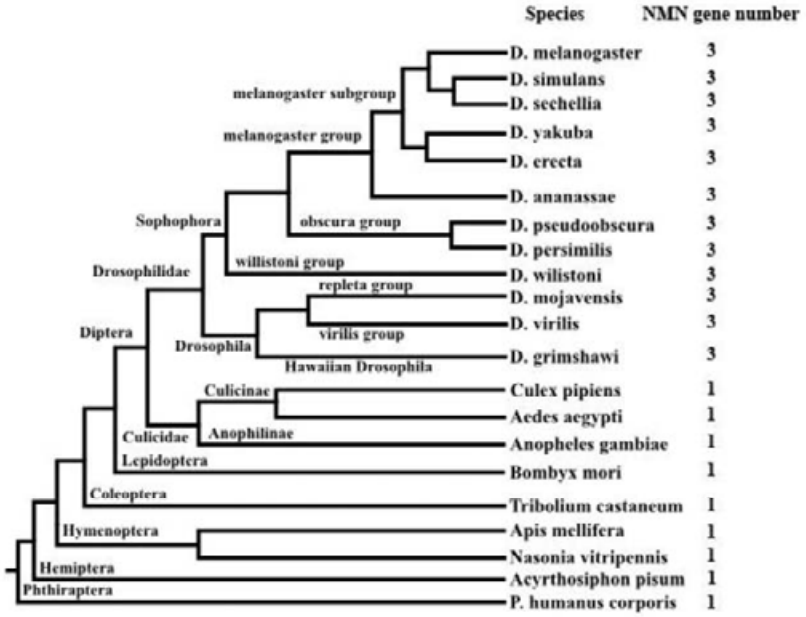


Figure S6: Phylogenic analysis of Nyo/Mey/Neo genes among arthropods.
22 arthropod genomes were screened through Tblastn for DNA sequences encoding either Nyo, Mey and Neo or their orthologous proteins (http://flybase.org/blast/). Duplication of a single ancestral Nyo/Mey/Neo gene (NMN) has occurred in *Drosophilidae*. In several *Drosophilidae* genomes, the three separated Nyo, Mey and Neo genes remain tightly linked.

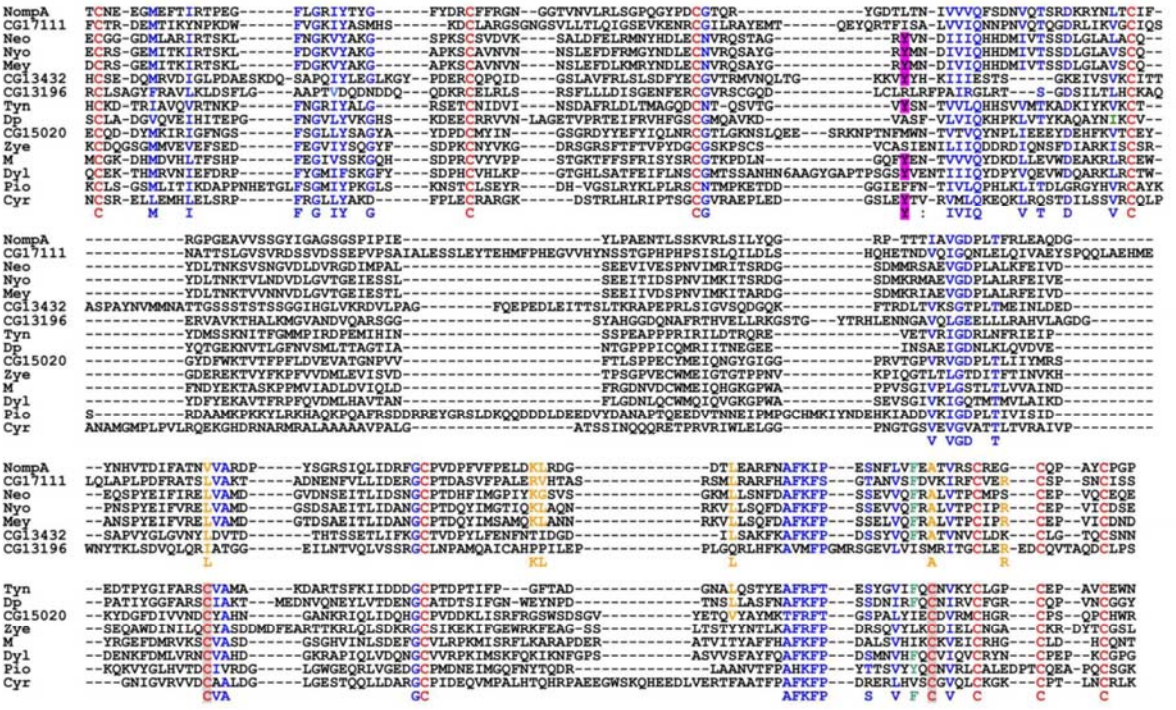


Figure S7: Alignment of *Drosophila* ZP domains.
Sequences were extracted from flybase (http://flybase.org/) and aligned using CLUSTALw2. The highly conserved Cysteine residues are shown in red, similar residues are in blue, orange or green. Tyrosine residues corresponding to the Y>C mutation in M^{tecta} is highlighted in magenta.

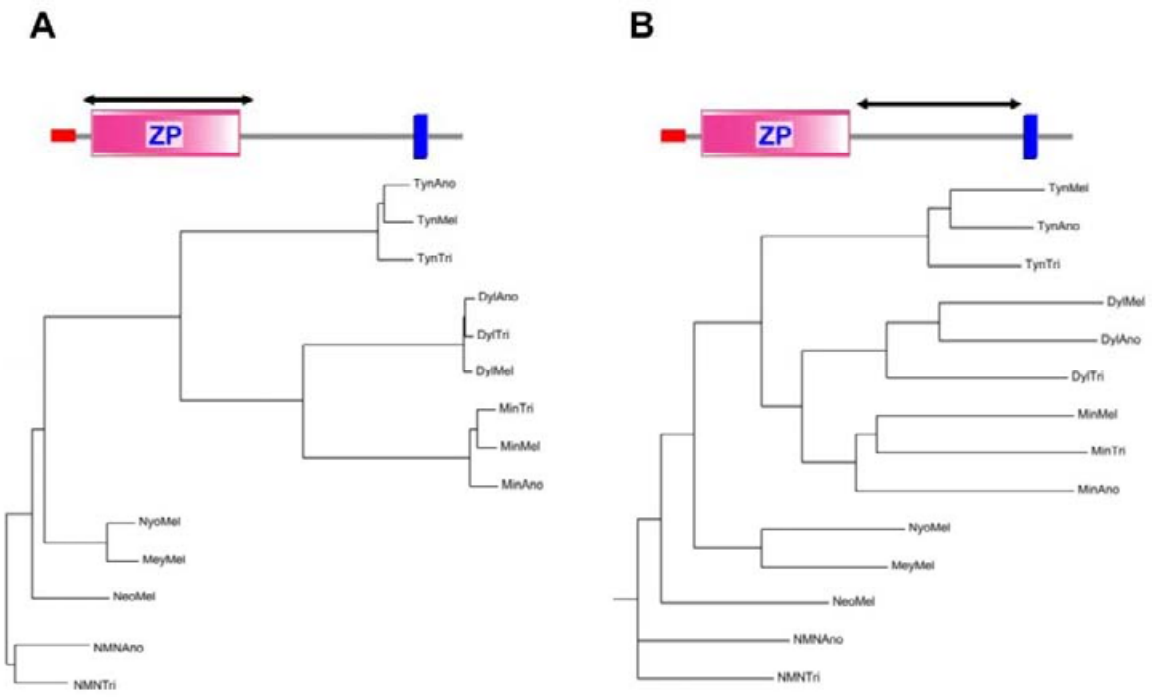


Figure S8: Phylogram grouping insect ZPD proteins according to conservation of their ZP domain (**A)** or that of the linker region located between the ZP domain and single-pass transmembrane region (**B**), see arrows. Sequences were extracted from *Drosophila melanogaster* (Mel) Dyl, Tyn, M(indicated as Min), Neo, Nyo, Mey and ortholog ZP protein sequences (Ano: *Anopheles gambiae*, Tri: *Tribolium castaneum*) using the SMART package (http://smart.embl.de/). Amino-acid sequences were then aligned with CLUSTALW2 and evolutionary relationships were best viewed through a phylogram tree (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html). Accession numbers for orthologs of ZP proteins Dyl (FBpp0073197), Tyn (FBpp0099481), Min (FBpp0073400), Neo (FBpp0084851), Nyo (FBpp0085152), Mey (FBpp0039851) are respectively: AGAP003211-PA, AGAP003012-PA, AGAP000786-PA, AGAP002316-PA, in Anopheles and: >GLEAN_01440, >GLEAN_00163, > GLEAN_03770, >GLEAN_03763 in *Tribolium*

DISCUSSION

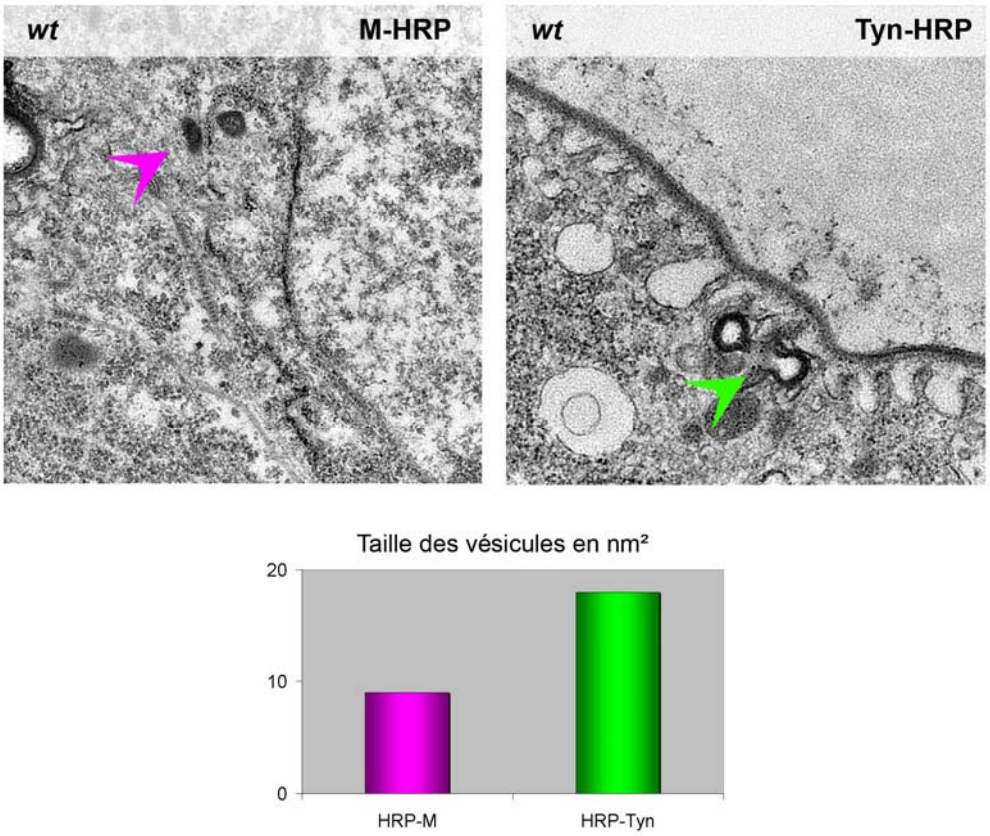
Les protéines Zona Pellucida (ZP) ont initialement été identifiées en tant que composants majeurs de la *Zona Pellucida*, la matrice entourant et protégeant les ovocytes (Bleil and Wassarman, 1980). Ces protéines sont caractérisées par la présence d'un domaine fonctionnel, extracellulaire, le domaine ZP, qui définit une famille de protéines ZPD évolutivement conservées. Les protéines ZPD sont impliquées dans l'organisation de diverses matrices extracellulaires (ECM) et leur altération chez l'Homme cause différentes affections, incluant des surdités congénitales ou des malformations rénales (pour revue (Jovine et al., 2005).

Par l'analyse systématique de l'ensemble des gènes ZPD de drosophile, nous montrons que Svb dirige l'expression de huit d'entre eux dans les cellules épidermiques formant les trichomes. L'expression de ces huit gènes est comprise entre le stade 14 et le stade 16, avec augmentation notable au stade 15. Cette fenêtre d'expression correspond aux deux événements majeurs de la différenciation d'épidermique : le remodelage de la face apicale ainsi que le début de la déposition de la cuticule (Moussian et al., 2006). Alors que les gènes *m*, *dyl*, *nyo*, *neo*, *mey* et *tyn* sont transcrits dans toutes les cellules formant des trichomes, *cyr* et *zye* montrent une expression différentielle entre des cellules produisant des trichomes dorsaux et des denticules. *zye* est spécifiquement exprimé dans les cellules à denticules, suggérant une fonction spécifique dans leur morphogenèse. La formation des extensions est régie par un mécanisme général identique pour le ventre et dos, l'assemblage de l'actine en faisceaux et leur croissance perpendiculairement à la face apicale des cellules (Chanut-Delalande et al., 2006). Ces structures diffèrent néanmoins dans leur forme générale : les denticules étant plus larges et crochues que les trichomes dorsaux. Zye pourrait alors jouer un rôle spécifique dans l'élargissement et/ou la courbure des denticules. Toutefois, l'expression ectopique de *zye* dans les cellules dorsales n'est pas suffisante pour transformer les extensions dorsales en structures de type denticules (données non publiées). L'expression de *cyr* était initialement décrite comme étant limitée aux cellules produisant les trichomes dorsaux (Jazwinska et al., 2003). Nous montrons ici que son expression est dynamique aux cours des derniers stades embryonnaires. Entre les stades 14 et 15, son expression est limitée aux cellules dorsales à trichomes puis elle s'atténue pour disparaître complètement au stade 16 et débuter sa transcription dans les cellules à denticules et ceci jusqu'au stade 17. Ce gène semble donc requis pour ces deux types d'extensions mais à différentes étapes de leur formation, suggérant qu'un même gène peut jouer plusieurs fonctions au sein d'un mécanisme

général. De plus, dans la dernière annotation du génome de la drosophile, nous avons identifié un gène ZPD supplémentaire, CG12814. Ce gène est lui aussi co-exprimé et co-régulé par Svb dans les cellules produisant des extensions ventrales et dorsales, faisant de lui le neuvième gène ZPD impliqué dans ce mécanisme cellulaire spécifique (supp3). Nous n'avons pas observé de variations évidentes du niveau d'expression de ces 9 gènes entre les différentes rangées cellulaires de la ceinture de denticules ou dans les différents types de trichomes. Ceci suggère donc que ce n'est pas une variation du niveau d'expression de l'un des gènes parmi les autres qui permet aux extensions d'acquérir une morphologie caractéristique à chacune d'elles. De plus, lors des expériences de sauvetage, nous avons utilisé un pilote ubiquitaire précoce, daG4, qui permet au transgène de compenser la perte de fonction du gène correspondant. Cela démontre que le contrôle strict de la temporalité d'expression n'est pas indispensable non plus pour la fonction de ces protéines.

Existe-t-il une spécificité de fonction parmi l'ensemble des neuf gènes exprimés dans les cellules à denticules ?

Svb co-règule un ensemble de neuf gènes ZPD structuralement apparentés, laissant penser que ces gènes correspondent à une duplication récente et gardent donc une fonction redondante. Chez C. elegans, plusieurs gènes ZPD sont aussi co-exprimés dans les cellules hypodermiques embryonnaires et jouent un rôle partiellement redondant dans la différenciation de la cuticule (Muriel et al., 2003; Sapio et al., 2005; Sebastiano et al., 1991). Nous montrons ici que chacun des huit gènes étudiés possède une fonction spécifique dans la morphogenèse épidermique. L'inactivation individuelle de chacun de ces 8 gènes provoque un défaut spécifique de la forme des denticules ; l'inactivation simultanée de *m*, *tyn* et *zye* montre un phénotype additif. Seuls les mutants *neo*, *nyo* et *mey* (individuels ou simultanés) montrent des phénotypes similaires, une réduction de la taille des denticules. Ces trois gènes proviennent probablement d'une duplication plus récente car *nyo* et *mey* sont encore associés en tandem à la même position génomique (supp 2). Finalement, les sauvetages *in vivo* démontrent que la perte de fonction d'une protéine ZPD ne peut être compensée par la surexpression d'une autre, montrant ainsi que chaque protéine ZPD possède une fonction spécifique dans la formation des denticules. Ce résultat surprenant confirme que, malgré le fort degré de similitude existant entre les protéines ZPD, elles présentent des fonctions non redondantes.



<u>Figure 27 :</u> Analyse ultrastructurale de la localisation de M-HRP et Tyn-HRP dans les cellules à denticules.

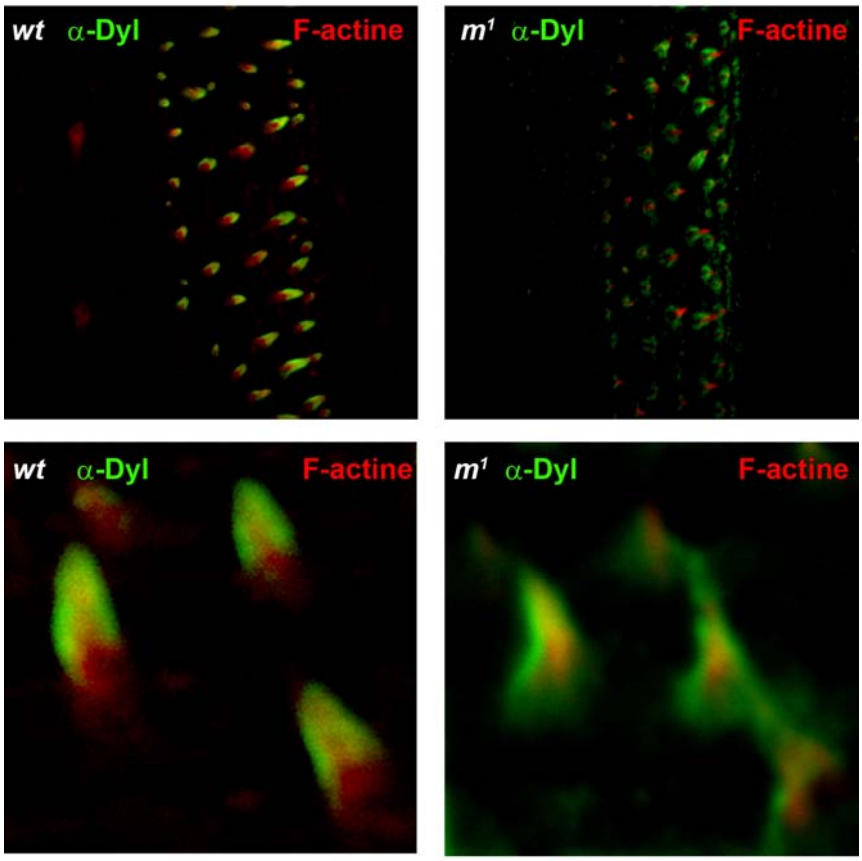
L'expression des transgènes *m*-HRP et *tyn*-HRP, dans des embryons sauvages, est dirigée par le pilote *m*-Gal4 dans l'ensemble des rangées cellulaires produisant des denticules. Image en MET à un grandissement X10 000 des embryons au stade 16. Les vésicules contenant M-HRP mesurent ~10nm² et marquées à la fois sur leur membrane et à l'intérieur (flèche rose). Les vésicules contenant Tyn-HRP sont plus grandes (~20nm²), et ne sont marquées que sur leur pourtour membranaires (flèche verte). En moyenne, les vésicules de sécrétion contenant Tyn-HRP sont deux fois plus grandes que celles contenant M-HRP (cf histogramme).

Comment des protéines partageant un domaine fonctionnel similaire peuvent avoir une fonction spécifique ?

Des données biochimiques suggèrent que la spécificité fonctionnelle de ces protéines passe par le domaine ZP lui-même (Wassarman, 2008). Il est proposé que le domaine ZP comporte deux sous-régions : la moitié N-terminale servant à la polymérisation et la moitié C-terminale déterminant la spécificité de cette interaction (Jovine et al., 2006; Monne et al., 2008). Récemment, trois protéines ne possédant que la partie N-ter du domaine ZPD ont été identifiées chez la drosophile (Jovine et al., 2006). De plus, des études biochimiques sur l'hémi-domaine ZP-N de ZP 3 montrent qu'il est capable de s'assembler en filaments (Jovine et al., 2006). De plus, l'étude phylogénétique du domaine ZPD révèle une évolution rapide de sa séquence protéique en dehors de la conservation à des positions stéréotypées des résidus cystéine (supp 5A). Ces données illustrent l'importance de ce domaine pour la fonction des protéines ZPD. Notre système de sauvetage offre la possibilité d'explorer l'importance fonctionnelle du domaine ZPD *in vivo*. L'échange du domaine ZPD de Tyn par celui de M (TynZPM) est suffisant pour sauver partiellement la perte de fonction de *m,* alors que l'échange inverse (MZPTyn) ne compense pas la perte de fonction de *tyn*. Ces résultats démontrent clairement que le domaine ZPD ne supporte pas à lui seul la spécificité fonctionelle de la protéine. Les domaines PAN de Try sont essentiels à son activité. Toutefois, ces domaines PAN ne sont pas capables de reprogrammer la fonction de M, puisque M(PAN) est incapable de restaurer la perte de fonction de *tyn,* sans toutefois altérer la fonction de M. La fonction de Tyn est donc due au dialogue concerté entre les domaines PAN et ZPD qui la composent. De plus, la région C-terminale, entre le domaine ZPD et le domaine transmembranaire, est fortement conservée entre orthologues respectifs chez les insectes, suggérant une pression de sélection importante et donc une fonction de cette partie de la protéine (Supp. 5B). Nous montrons ainsi que la spécificité fonctionnelle des protéines ZPD ne peut pas être seulement limitée au domaine ZPD mais qu'elle est portée par de multiples régions protéiques.

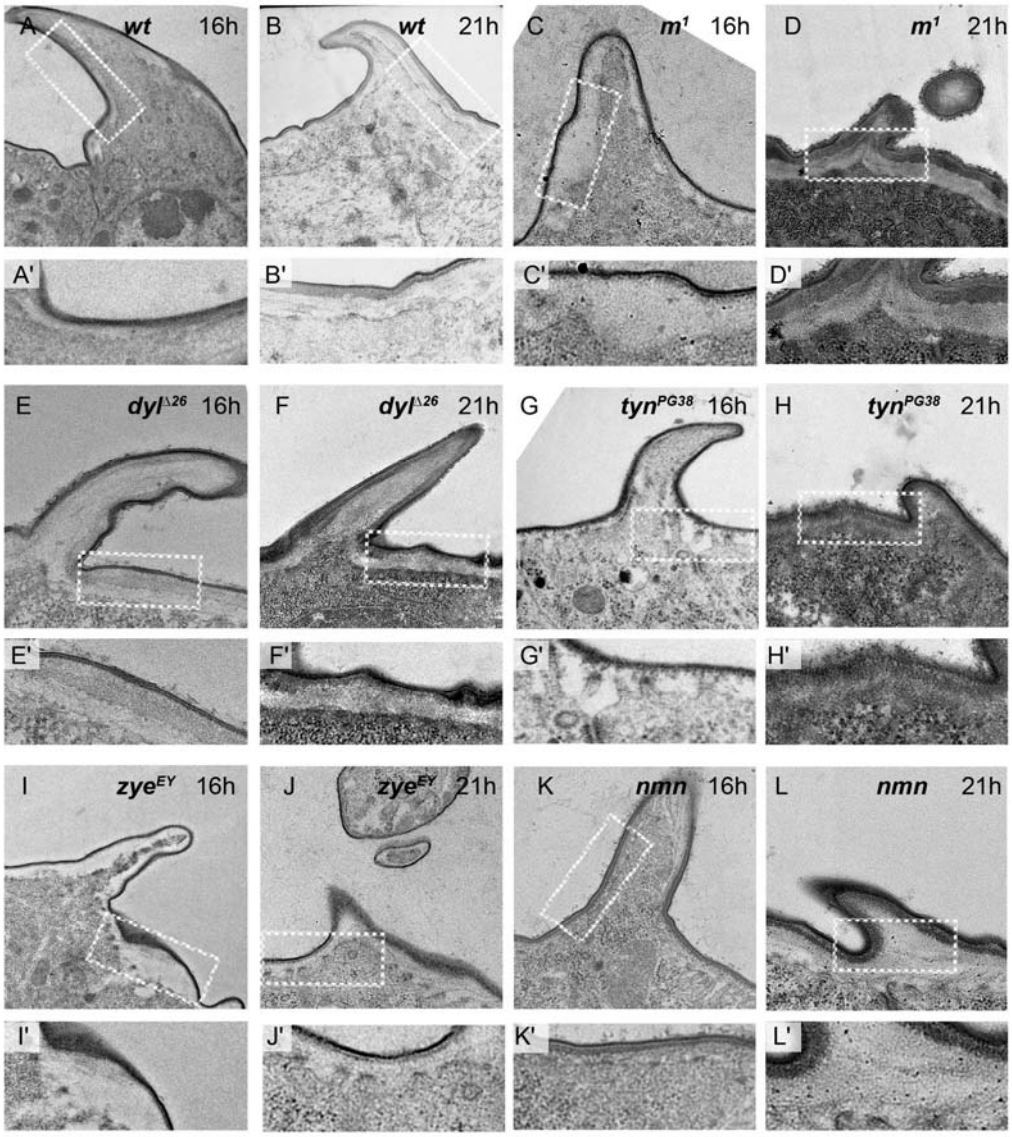
Existe-t-il une corrélation entre la localisation de ces protéines et leur spécificité fonctionnelle ?

Les différentes protéines ZPD étudiées se localisent dans des sous-domaines distincts de la denticule, qui corrèlent avec la localisation des défauts observés dans les mutants correspondants. Dyl s'accumule à l'extrémité de la denticule, qui se retrouve divisée dans le



<u>Figure 28 :</u> Localisation de la protéine Dyl.
Dans les embryons sauvages, la distribution de Dyl est restreinte à la pointe de la denticule. Dans les mutants m^1, nous observons que la distribution de Dyl s'étend à l'ensemble de la denticule, indiquant que M est nécessaire à la dans la restriction du domaine d'accumulation de Dyl.

mutant, leur donnant un aspect fourchu. M est enrichi dans la région médiale de l'extension cellulaire où les mutants *m* montrent une absence de constriction, donnant à la denticule son aspect triangulaire. Les denticules des mutants *tyn* et *zye* sont affectées à leur base, où chacune des deux protéines est accumulée. L'analyse ultrastructurale révèle que les défauts de forme observés sont la conséquence d'un détachement local de la membrane apicale par rapport à l'aECM, suggérant que les protéines ZPD assurent la cohésion entre la cuticule et la membrane. Des résultats récents montrent que Piopio (Pio) jouerait un rôle équivalent dans les cellules lisses, où elle semble aussi associée à la cuticule (Bokel et al., 2005). Ces mêmes auteurs montrent que l'absence de *pio* entraîne des détachements de la cuticule. De plus, l'analyse ultrastructurale de la localisation des protéines de fusion, M-HRP et Tyn-HRP, a révélé que ces deux protéines s'accumulent spécifiquement dans la procuticule. Ces protéines sont donc des constituants de la cuticule, s'incorporant dans la couche souple et maintenant un lien avec la membrane apicale. Ainsi, les protéines ZPD modifieraient la composition locale de l'aECM et maintiendraient la cuticule attachée à la membrane apicale. La denticule étant une architecture complexe, nous proposons que les protéines ZPD forment, par leur association, un échafaudage hétérogène nécessaire à l'attachement de la cuticule le long de l'extension pour obtenir une forme correcte (figure 8 de l'article). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons observé les localisations de ces protéines dans un contexte mutant pour l'un ou plusieurs des autres gènes ZP. Dans les mutants *m*, la protéine Dyl est délocalisée, sa distribution ne se limite plus à l'extrémité de la denticule mais s'étend jusqu'à la région médiale, où M est normalement accumulée (figure 28). Ce résultat suggère que M restreint la localisation de Dyl via une interaction directe et qu'il pourrait en être de même pour les autres protéines ZPD dans les zones de recouvrement. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence une délocalisation des autres protéines ZPD, peut être à cause d'une résolution insuffisante due à la petite taille de la denticule (1,5 à 1,8 µm). Chacune des quatre protéines observées possède une localisation spécifique ne se recouvrant que partiellement, suggérant une interaction limitée dans l'espace entre deux protéines. Les données mammifères montrent que ZP1 et ZP2 s'associent en hétérodimères pour former des fibres, qui seront rattachés à la membrane de l'ovocyte par ZP3 (Wassarman et al., 2004). Dans le cas des protéines Dyl, M, Tyn et Zye, nous avons observé des détachements membrane/aECM, suggérant que, comme ZP3, elles pourraient ancrer la cuticule à la membrane apicale, alors que pour les protéines Neo, Nyo et Mye, nous n'avons pas constaté de détachements (figure 29). Nous avons déjà vu que les mutations de ces trois gènes constituent une même classe phénotypique, suggérant leur implication dans un même mécanisme fonctionnel. Elles pourraient donc constituer des



<u>Figure 29 :</u> Analyse ultrastructurale de défauts de denticules dans les mutants *m, dyl, tyn, zye* et *nmn*.

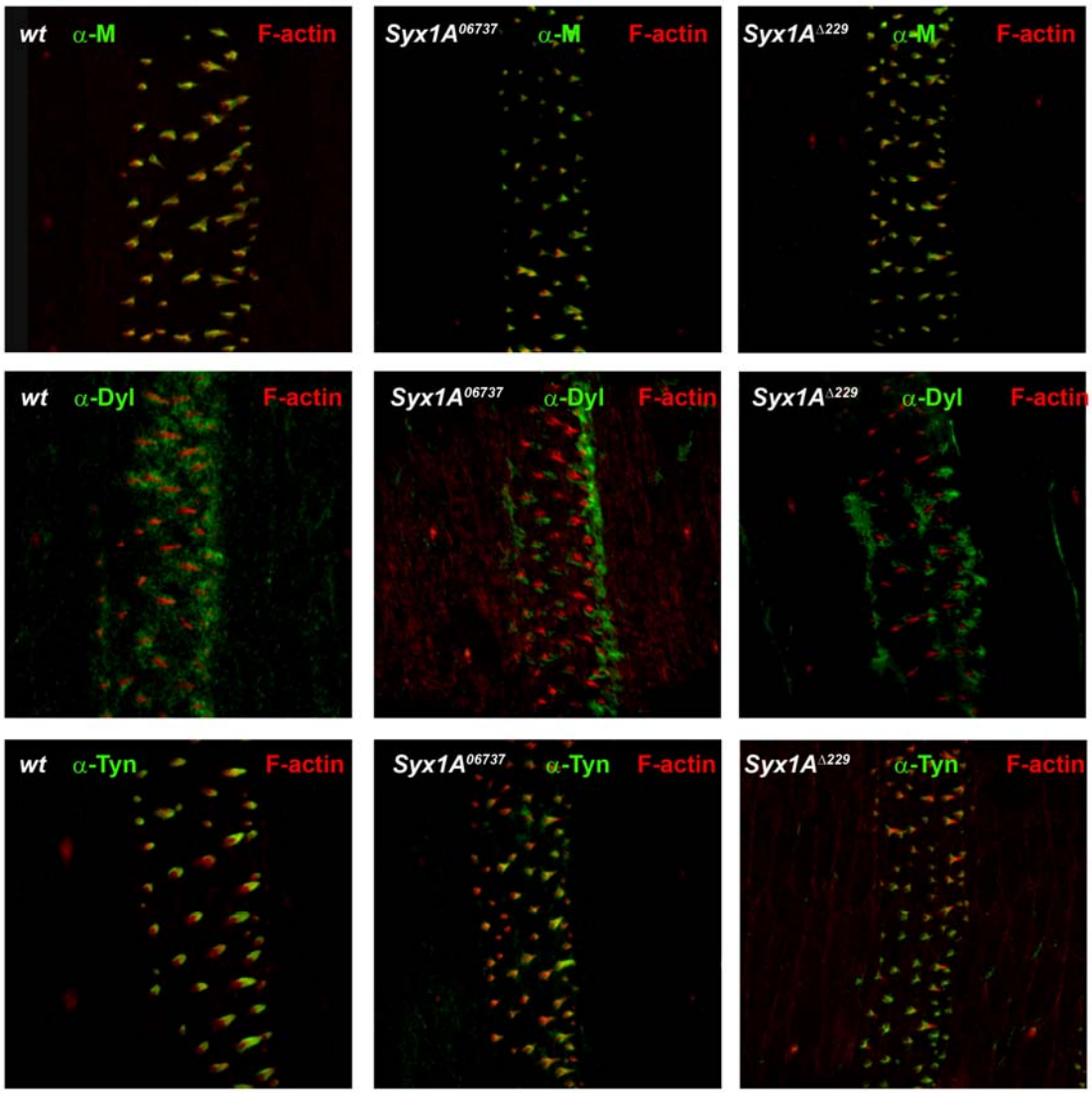
Images en MET d'une cellule à denticules dans des embryons sauvages, m^{1}, $dyl^{\Delta 26}$, tyn^{PG38}, $zye^{Ey05938}$ et NMN dans des embryons au début du stade 17 (A, C, D, G, I et K) ou juste avant éclosion (B, D, F, H, J et L). L'inactivation des gènes ZP perturbe les interactions entre la membrane et la cuticule dans différentes régions de la surface apicale. Les gros plans (A', C', D', G', I' et K') montrent un détachement région-spécifique dans les différents mutants. En fin d'embryogénèse, la cuticule s'est épaissie (B, D, F, H, J et L) surtout la procuticle en contact direct avec la membrane apicale. Sur les grossissements (B', D', F', H', J' et L'), les défauts observables cinq heures plus tôt ne sont plus visibles. Les protéines ZP sont donc requises au cours des étapes précoces de la synthèse de la cuticule.

hétéromères fibrillaires, comme ZP1/ZP2 (Jovine et al., 2002). Les analyses réalisées en MET sont effectuées sur des embryons de 19h APF, dans lesquels les trois couches de la cuticule sont synthétisées mais dont la maturation n'est pas encore achevée. La procuticule, en contact direct avec la membrane apicale va s'épaissir à la fin de l'embryogenèse et jusqu'à l'éclosion de l'embryon, principalement grâce à la sécrétion de chitine (Moussian et al., 2006). Nos analyses des embryons mutants pour les protéines ZPD à 22h APF (juste avant l'éclosion) n'ont révélé aucun détachement pour l'ensemble des mutants (figure 29). En revanche, pour les mutants *neo*, *nyo* et *mye*, nous avons remarqué que cette couche est moins organisée et moins dense, suggérant un défaut dans l'association des fibres de chitine (figure 29). Pourtant, les mutants de la chitine synthase, *krotzkopf verkehrt (kkv)*, responsable de la production de chitine ne montrent aucun défaut de la morphologie générale des denticules, alors que la chitine et la procuticule y sont presque totalement absentes (Moussian et al., 2005). Ces données suggèrent donc que ce n'est pas l'épaisseur mais plutôt la composition en protéines ZPD de la procuticule qui est essentielle à forme générale de la denticule. Neo, Nyo et Mye pourraient, comme ZP1 et ZP2, former des fibres qui seront incorporées dans la procuticule pour y structurer l'assemblage des feuillets de chitine.

Nous avons démontré que M et Tyn s'accumulent dans la procuticule et ceci dans des régions spécifiques de la denticule, où elles jouent un rôle essentiel dans le maintien du contact membrane apicale/aECM. Nos données suggèrent que Dyl, M, Tyn et Zye se localisent dans la procuticule où elles attachent la cuticule alors que Neo, Nyo et Mye en sont des composants fibrillaires (figure 29).

Comment ces protéines sont elles capables de se localiser spécifiquement dans une région déterminée ?

Il est possible que les propriétés intrinsèques des protéines ZPD contribuent à un échafaudage ordonné, qui organise la membrane apicale autour de l'extension cellulaire. Comme le suggèrent les données structurales, il existe peut-être une spécificité d'assemblage codée par la partie C-terminale du domaine ZPD (Jovine et al., 2004). Les zones de co-localisation entre deux protéines ZPD pourraient correspondre à la formation d'hétérodimères. M co-localise avec deux autres protéines ZPD : Dyl dans la région la plus apicale et Tyn dans la région basale. La spécificité d'assemblage ne semble donc pas uniquement liée aux propriétés intrinsèques du domaine ZP. Nous avons vu que la temporalité d'expression n'est pas indispensable à la fonction des protéines ZPD. La distribution des protéines ZPD pourrait



<u>Figure 30 :</u> Localisation des protéines M, Tyn et Dyl dans un contexte mutant pour la syntaxine 1A.

M se localise tout autour de la partie médiale de la denticule. Dans les deux mutants *syx1A* observés la localisation de M est identique à celle observée dans des embryons sauvages, démontrant que la Syx1A n'est pas impliquée dans sa localisation correcte. Dyl se localise à la pointe de la denticule des cellules sauvages. Dans les mutants *syx1A*, la protéine Dyl est toujours correctement adressée et localisée. Tyn est localisée à la base de la denticule, tout autour des faisceaux de F-actine et nous n'observons pas de défauts de cette localisation en absence de Syx1A, indiquant que Syx1A ne semble pas jouer un rôle crucial dans l'adressage de ces protéines ZPD.

être due, au moins en partie, à leur adressage spécifique via la machinerie de trafic intracellulaire. Au cours de leur maturation, les protéines ZP2 et ZP3 sont incorporées dans des vésicules de sécrétion où elles vont être assemblées. Ces vésicules vont ensuite fusionner avec la membrane de l'oocyte pour y déposer les hétéromères de ZP en surface (Wassarman et al., 2004). Nos analyses préliminaires en MET suggèrent en effet que les protéines M-HRP et Tyn-HRP ne suivent pas les mêmes voies de sécrétion. M-HRP est retrouvée dans de petites vésicules qui cheminent dans le cytoplasme à l'intérieur de la denticule, suggérant que M est directement dirigée dans sa région d'accumulation. Dans le cas de Tyn, on retrouve des vésicules fusionnées à la base des denticules, dans une quantité moindre que pour M mais surtout de taille plus importante (figure 27). Ces données sont compatibles avec l'hypothèse que les protéines M et Tyn sont acheminées au compartiment apical *via* un transport vésiculaire différent. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la localisation des protéines ZPD en l'absence d'une protéine connue pour son rôle dans l'adressage apical de composants cuticulaires, la syntaxin 1A (Syx1A) (Moussian et al., 2007). Syx1A est une protéine T-SNARE impliquée dans la fusion des vésicules à la membrane apicale des cellules polarisées. La cuticule des mutants *syx1A* a une épaisseur réduite et certaines couches sont soit affectées soit manquantes, suggérant que des enzymes extracellulaires impliqués dans l'assemblage ou la pigmentation ne sont pas correctement adressées (Moussian et al., 2007). Toutefois, l'assemblage de la chitine ne semble pas affecté dans ces mutants, ainsi que la distribution des protéines Pio(ZPD), Serpentine (Srp) (une chitine désacétylase) ou Knickkopf (Knk) (une protéine organisatrice de la procuticule). Nous montrons que la localisation des protéines M, Dyl, Tyn et Zye n'est pas affectée en l'absence de *syx1A* (figure 30). Les protéines membranaires peuvent gagner le domaine apical ou baso-latéral des cellules polarisées par diverses voies d'exocytose. Lorsque la vésicule est formée, elle se sépare du Golgi après hydrolyse du GTP par la GTPase GAP (GTPase activating protein). Elle sera ensuite dirigée vers le compartiment accepteur grâce aux protéines Rab (protéines d'adressage) restées à sa surface. L'accostage au compartiment receveur est facilité par l'interaction des protéines SNAREs qui sont associées à la vésicule (v-SNARE) et à la membrane du compartiment accepteur (t-SNARE) (pour revue (Jahn and Scheller, 2006). La localisation « hyperspécialisée » des protéines ZPD, offre l'opportunité de mieux comprendre les mécanismes de l'adressage des protéines cuticulaires. Dans le laboratoire, Hélène Chanut mène un crible génétique à la recherche des mutations modifiant la localisation subcellulaire de Dyl. Pour cela nous utiliserons un ensemble de petites déficiences couvrant le bras gauche

du chromosome II, ainsi que les mutants disponibles pour les protéines d'adressage à l'apical, tel que les protéines Rab, t-SNARE ou v-SNARE.

La distribution spécifique des protéines ZPD dans la membrane des cellules à denticules révèle une sous-compartimentalisation supplémentaire du domaine apical, caractéristique de ces extensions. En effet, l'extension crée un domaine infra-apical où les différentes protéines ZPD s'accumulent de manière ordonnée et distincte des marqueurs spécifiques les plus apicaux.

Le domaine membranaire spécifique de l'extension cytoplasmique interagit-il fonctionnellement avec les déterminants généraux de la polarité cellulaire ?

Nous montrons que l'absence des protéines ZPD les plus basales, Tyn et Zye, diminue l'accumulation des composants de la SAR et de la ZA dans des cellules à denticules. En effet, Arm, un des composant principal de la SAR, est enrichi dans les jonctions des cellules à denticules (Price et al., 2006). De même, Shg, un composant essentiel de la ZA, est aussi enrichi dans les cellules à denticules. Dans les mutants *tyn* ou *zye* nous montrons qu'il n'y a plus de différence d'accumulation de ces deux marqueurs entre les cellules lisses et les cellules à denticules, indiquant que les protéines ZPD sont nécessaires au maintien de ces complexes de jonction. Cela suggère une interaction entre les protéines ZPD Tyn et Zye et les complexes de jonction/polarité afin d'assurer le renfort des jonctions et des déterminants apicaux dans les cellules à denticule. La réorganisation de jonctions cellulaires est un évènement critique pour les changements de forme cellulaire, comme l'intercalation cellulaire lors de l'extension de la bandelette germinale ou la constriction apicale pour l'invagination du mésoderme (Lecuit and Lenne, 2007). Lors de la fermeture dorsale, les cellules épidermiques vont s'étirer le long de l'axe D/V pour former des rangées cellulaires alignées (Price et al., 2006). Pour cela les cellules vont passer de trois contacts à quatre contacts cellulaires, et donc devoir établir un contact cellulaire supplémentaire (communication Robert Simone, 50th Annual Drosophila Reseach Conference, Chicago 2009). Les cellules à denticules vont donc subir en plus de leur allongement dans l'axe D/V, des modifications des jonctions intercellulaires ainsi que de tout le compartiment apical. En effet, la poussée perpendiculaire des faisceaux d'actine déforme ce compartiment et exige probablement une architecture plus robuste de jonctions apicales, expliquant l'accumulation des marqueurs Arm et Shg. De façon intéressante, il a été montré que Pio et Dumpy (Dp), deux protéines ZPD sont nécessaires dans la réorganisation des AJs au cours de la formation tube trachéal la dans l'embryon

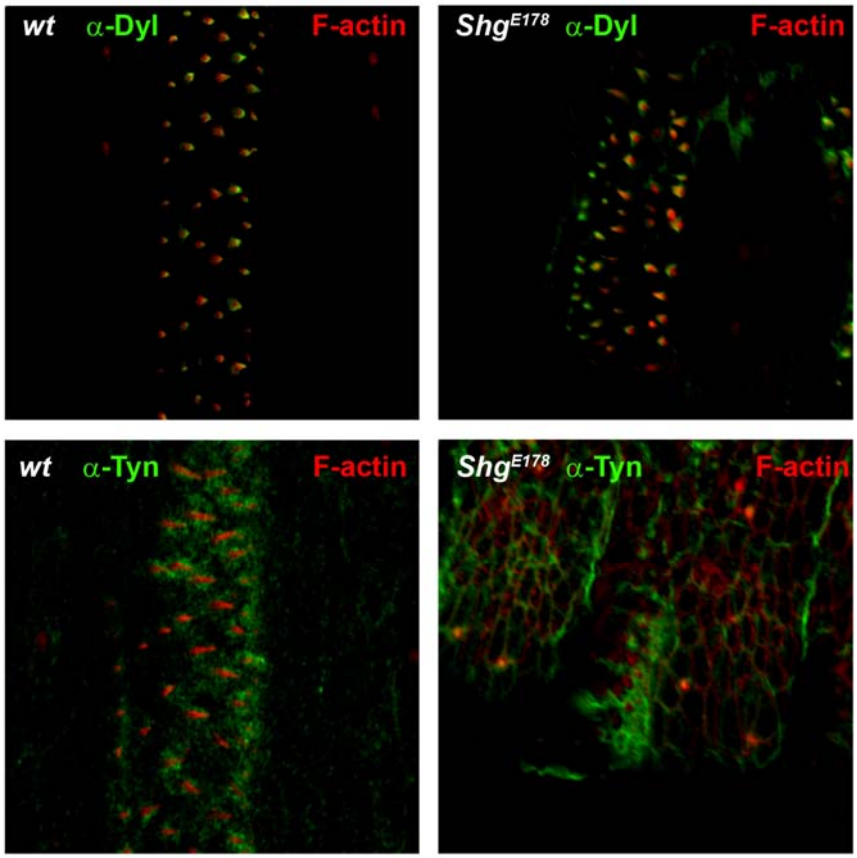


Figure 31 : Localisation des protéines Dyl et Tyn dans un contexte mutant pour la DE-Cadhérine, *Shg*^{E178}.
Dans les mutants *Shg*^{E178}, la localisation de M ne semble pas être affectée, malgré les défauts de développement bloquant les embryons au stade 15. A ce stade, les denticules n'ont pas atteint leur taille définitive. Tyn se localise à la base de la denticule, autour des faisceaux de F-actine. Dans les mutants *Shg*^{E178}, la protéine est toujours correctement adressée et localisée. Toutefois, une localisation de Tyn au niveau des contours cellulaires des cellules lisses semble être renforcée dans ce contexte mutant.

(Jazwinska and Affolter, 2004). De même, la protéine ZPD Hensin/DMBT1 influence la polarité cellulaire épithéliale et promeut la formation de complexes de jonctions (Takito and Al-Awqati, 2004). Nous montrons que des protéines ZPD, Tyn et Zye, sont nécessaires au maintien des AJs dans les cellules épidermiques à denticules. En plus de la délocalisation des marqueurs apicaux, nous avons observé une altération générale de la forme du compartiment apical des cellules à denticules. Avant la formation des denticules, ces cellules adoptent une forme rectangulaire et leur surface apicale est réduite de moitié, alors que les cellules lisses ne subissent aucun changement morphologique. Dans les mutants *tyn* ou *zye*, nous avons observé que les cellules à denticules conservent une forme et une surface quasi identique à celles des cellules lisses, révélant ainsi un défaut du remodelage apical qui leur est caractéristique (figure 7 de l'article). De plus, l'étude ultrastructurale des défauts met en évidence un détachement des AJs, démontrant que ces deux protéines ZPD contribuent à leur maintien. Nous avons aussi testé si Tyn, et plus généralement les protéines ZPD, étaient toujours correctement localisées dans un contexte mutant pour l'une des protéines de jonctions. Un seul allèle mutant pour *shg* bénéficie d'une contribution maternelle suffisante pour atteindre le stade 15 et la formation des denticules (figure 31). Dans ce contexte et malgré des défauts plus généraux, les protéines ZPD sont correctement adressées, suggérant que l'intégrité des AJs n'est pas essentielle à leur localisation. Il est possible que les défauts observés soient une conséquence mécanique du remodelage infra-apical, qui nécessite un maintien plus robuste des jonctions. Pour tester cette hypothèse, nous avons défini la localisation des marqueurs apicaux dans un contexte mutant pour *svb*, où l'ensemble des protéines ZPD n'est donc plus présent. Nous n'avons observé ni des défauts de la forme apicale des cellules, ni de l'accumulation des marqueurs jonctionnels. Ces données suggèrent donc que le remodelage de la forme apicale est indépendant de Svb et que les défauts observés dans les mutants *tyn* et *zye* sont probablement une conséquence mécanique de la poussée des faisceaux d'actine à la face apicale. Ce remodelage de la région infra-apicale ajoute une contrainte physique supplémentaire aux jonctions apicales, qui pour maintenir le lien intercellulaire nécessitent l'interaction des protéines ZPD.

L'ensemble de ces données montrent que les modifications locales de l'aECM sont nécessaires à l'organisation polarisée des cellules épithéliales ainsi qu'à leur morphogenèse. La distribution spécifique des protéines ZPD ouvre de nouvelles perspectives dans l'analyse et la compréhension de la machinerie d'adressage spécifique des protéines vers des sous domaines infra-apicaux de la membrane et leur interaction avec les déterminants de polarité et

des jonctions cellulaires. L’ensemble de ces résultats montre que les cibles de Svb identifiées jusqu'ici agissent collectivement pour promouvoir la formation correcte des extensions cellulaires.

IV. M : paradoxe d’une diffusion.

INTRODUCTION

Notre étude de la famille ZPD chez la Drosophile a conduit à l'identification de 9 gènes ZPD co-régulés par Svb et directement impliqués dans le remodelage apical des cellules épidermiques embryonnaires. La denticule est cependant un système modèle dont la petite taille limite la résolution de son étude. Nous nous sommes donc intéressés à un autre épithélium, celui de l'aile adulte, dans lequel le rôle de certaines protéines ZPD a déjà été établi.

Les cellules épithéliales de l'aile engagent une réorganisation de leur cytosquelette d'actine au cours de la différenciation, afin de modifier leur forme. Entre 32 et 60 heures, après la formation du puparium, l'épithélium est composé de cellules colonnaires, qui vont ensuite s'aplatir pour quadrupler leur superficie. Chaque cellule va aussi émettre à sa face apicale une extension riche en actine, préfigurant les trichomes de l'aile adulte (Fristrom et al., 1993). En absence de *m*, la taille de l'aile est fortement réduite à cause d'un défaut d'étirement des cellules épithéliales (Roch et al., 2003). De plus, les trichomes sont déformés et ramifiés, montrant que M, comme dans l'épiderme embryonnaire, est nécessaire à la réorganisation de la forme des cellules de l'aile adulte. Nous avons donc testé l'existence de fonctions cellulaires de M communes à ces deux processus de morphogenèse.

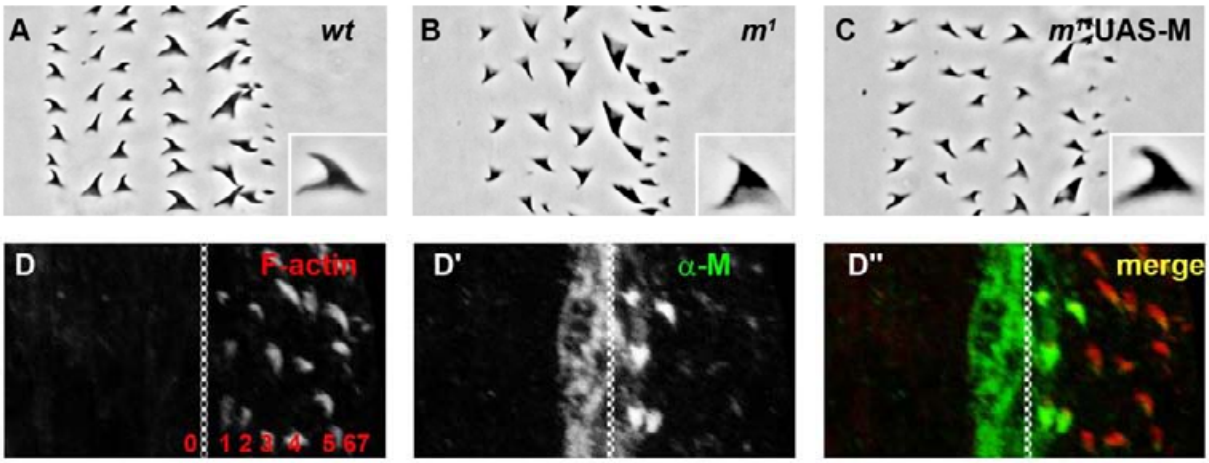
M n'est pas la seule protéine ZPD impliquée dans la différentiation des cellules de l'aile. Comme pour *m*, des mutations de *dusky* (*dy*) ont été identifiées, il y a fort longtemps, à cause des défauts qu'elles produisent sur la morphologie des ailes adultes (*m* a été isolé en 1910 par T. H. Morgan et *dy* en 1916 par C. Ponts). Le gène *dy* est le voisin direct du gène *m* et une petite déficience, *Df(1)MR*, qui enlève les deux gènes, provoque une réduction importante de la taille de l'aile (DiBartolomeis et al., 2002). Les mutants ponctuels dy^1 ou m^1 ont des phénotypes semblables, avec une réduction moins prononcée de la taille de l'aile que celle observée dans la déficience *Df(1)MR* (Dobzhansky, 1929). *piopio* (*pio*) et *dumpy* (*dp*) ont été identifiés au cours d'un crible à la recherche de mutations affectant l'adhérence entre les deux feuillets épithéliaux de l'aile (Prout et al., 1997; Walsh and Brown, 1998), un phénotype bien connu pour l'inactivation des intégrines. Il existe différents allèles mutants de *dp* classés selon qu'ils causent: l'obliquité des ailes (o), la létalité (l) ou des irrégularités hypodermiques du thorax, appelées vortices (v) (Carlson, 1959). Les mutants dp^o présentent des ailes dont l'extrémité distale n'est plus arrondie mais oblique, montrant que ce gène est nécessaire à la

formation correcte de l'aile. Un troisième gène ZPD (incomplet), *papillote* (*pot*), a aussi été identifié pour son rôle dans le maintien des deux feuillets de l'aile (Bokel et al., 2005). L'analyse du transcriptome alaire a aussi permis de caractériser les variations d'expression génique au cours de la morphogenèse de l'aile (Ren et al., 2005). Comme *miniature,* plusieurs gènes ZPD sont fortement activés au cours de la morphogenèse, notamment *dusky, cypher* et *dusky-like*. La morphogenèse de l'aile nous offre ainsi un nouveau modèle d'étude de la fonction des protéines ZPD.

Existe-t-il une spécificité de fonction de pour chacune des ZPD au cours de la morphogenèse de l'aile ?

Les études déjà réalisées suggèrent donc que les protéines ZPDs sont impliquées de manière générale dans le maintien du lien entre la membrane plasmique et l'aECM, dans les cellules épidermiques embryonnaires et adultes. Cette fonction d'ancrage de l'aECM à la membrane apparaît paradoxale, car les protéines ZPD sont généralement réputées pour être clivées en dissociant la région extracellulaire du domaine trans-membranaire. La présence d'un site potentiel de clivage par la Furine est d'ailleurs une signature caractéristique de la famille ZPD. Les Furines sont des proprotéines convertases, dont le site consensus de clivage est R- R/L- R/L -R (Hosaka et al., 1991). L'excrétion de ZP3 n'est cependant pas altérée par la mutation du site tétrabasique de cette protéine, montrant qu'il n'est pas indispensable au relargage de la protéine dans le milieu extracellulaire (Zhao et al., 2002). Il a été suggéré que la sécrétion du complexe ZP2/3 se fait en réalité de manière concomitante à leur assemblage (Jovine et al., 2007), grâce à un changement conformationnel exposant des domaines hydrophobes facilitant le passage à travers la membrane (Jovine et al., 2007). Néanmoins, pour la protéine ZPD, uromoduline, il a été montré que sa partie C-terminale est clivée au niveau d'un site protéolytique conservé (Santambrogio et al., 2008). Le rôle du motif tetrabasique évolutivement conservé dans les protéines ZPD reste finalement mal connu et il en va de même pour l'importance fonctionnelle d'une éventuelle maturation par clivage des protéines ZPD.

M est-elle clivée ? Et si oui comment joue-t-elle son rôle dans le maintien du contact membrane apicale/aECM ?



<u>Figure 32 :</u> Fonction de *m* au cours de la morphogénèse épidermique.
A-C) Image en contraste de phase de l'ensemble des 7 rangées de denticules sauvages avec un grandissement de la rangée 4 caractéristique du phénotype, en bas à droite. (A), m^1 (B) et sauvetage par le transgène UAS-*m* (C). B) Les denticules m^1 ont une forme triangulaire sur une base élargie. C) L'expression de l'UAS-*m* par le pilote enG4, dirigeant l'expression du transgène dans les rangées 0-1 permet un sauvetage phénotypique des denticules qui s'étend jusqu'en rangée 4. D-D'') Image en microscopie confocale des cellules à denticule du segment A3. D) Coloration de la F-actine par la phalloïdine-rhodamine. D') Immunocoloration de M. D'') Superposition de D et D'. L'expression de M est limitée aux rangées 0-1 par le pilote enG4. La rangée 1, fortement marquée au niveau des denticules, montre une localisation correcte de la protéine, alors qu'en rangée 0 M est strictement cytoplasmique. Les rangées 2 à 4 sont marquées au niveau des denticules.

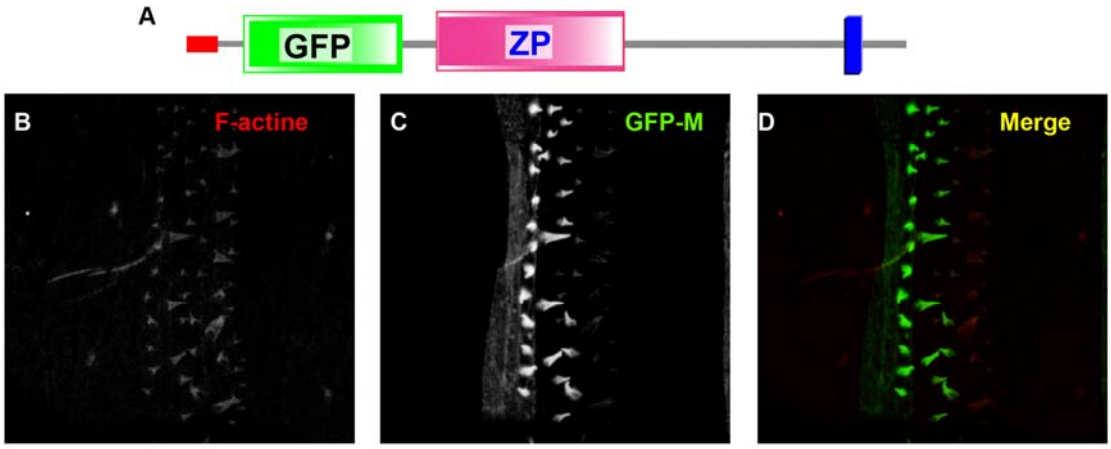
RESULTATS

Nos premières expériences de sauvetage phénotypique de la mutation m^1, mettent en évidence que M serait capable d'agir à distance des cellules sources de sa production. Nous avons donc recherché la nature des mécanismes pouvant expliquer cet effet à distance, dit « cellulaire non-autonome ».

1) Min diffuse et se relocalise précisément sur la denticule.

Pour le sauvetage du phénotype m^1, nous avons utilisé deux pilotes : *da*-Gal4 dirigeant une expression ubiquitaire, et *en*-Gal4 se limitant aux rangées cellulaires 0-1 de chaque segment de l'épiderme embryonnaire (figure 32). L'expression ubiquitaire précoce du transgène UAS-*m* permet de restaurer le phénotype sauvage pour l'ensemble des sept rangées de denticules. L'expression limitée aux cellules En restaure la forme sauvage des denticules des cellules de la rangée 1 qui expriment En (figure 32). Cependant, on observe un sauvetage phénotypique évident de la forme des denticules produites par les rangées de cellules immédiatement postérieures, c'est-à-dire des rangées 2, 3 et 4. Ces résultats indiquent que M peut agir de manière cellulaire non-autonome au cours de la morphogenèse épidermique embryonnaire. Pour approfondir cette analyse, nous avons étudié la localisation de la protéine codée par le transgène, tirant parti de l'absence de signal détectable par notre anticorps dans les embryons m^1. Dans les cellules de la rangée 0, qui ne forment pas de denticule, la protéine « transgénique » présente une distribution cytoplasmique fortement enrichie à la surface apicale (figure 32D). Dans les cellules de la rangée 1, nous observons en plus une forte accumulation de M dans les denticules, similaire à celle observée pour la protéine endogène. De plus, un signal très spécifique est visible dans les extensions des cellules non productrices, et ceci jusqu'à la rangée 4. Des résultats similaires ont été obtenus avec une fusion GFP-Miniature génétiquement fonctionnelle, dont la spécificité de détection ne fait aucun doute (figure 33). Ensemble, ces résultats confirment donc que M est capable de se localiser précisément dans les extensions des cellules adjacentes à sa source de production et d'y restaurer la morphogenèse correcte des denticules.

Si ces données démontrent une diffusion de la protéine Miniature « transgénique », nous avons voulu tester cette propriété dans le cas de la protéine endogène. En effet, avec le système UASGal4, la protéine M est produite en quantité très importante et surtout plus précocement qu'à partir du gène endogène. Il est donc théoriquement possible que la diffusion



<u>Figure 33 :</u> Localisation M-GFP dans les cellules à denticules dans un contexte sauvage. Image en microscopie confocale des cellules à denticule du segment A3. B) Coloration de la F-actine par la phalloïdine-rhodamine en rouge. C) Localisation de M par la GFP en vert. L'expression de M est limitée au rangée 0-1 par le pilote enG4. Les rangées 1 à 3, sont fortement marquées au niveau des denticules, alors qu'en rangée 0 M est strictement cytoplasmique. Les rangées 4 et 5 sont marquées au niveau des denticules mais de manière moins intense.

observée soit provoquée par ces conditions artificielles d'expression. Nous avons alors choisi d'étudier l'éventuelle diffusion de M dans les cellules de l'aile adulte. Ce tissu est bien adapté à la réalisation d'analyse génétiques mosaïques, *i.e.*, de générer des clones de cellules mutantes au sein d'un tissu sauvage grâce la recombinaison mitotique par le système FLP/FRT (figure 34). Les résultats obtenus par Serge Plaza confirment que la protéine endogène peut restaurer un phénotype cellulaire sauvage dans les cellules mutantes adjacentes, soutenant que la diffusion est bien une qualité intrinsèque à la protéine M.

La mise en évidence de cette fonction diffusible de M est inattendue, surtout à la lumière des résultats de MET, où nous montrons l'importance de cette protéine dans l'attachement local de la cuticule à la membrane apicale. Nous avons donc voulu approfondir nos investigations sur cette question dans la suite nos travaux.

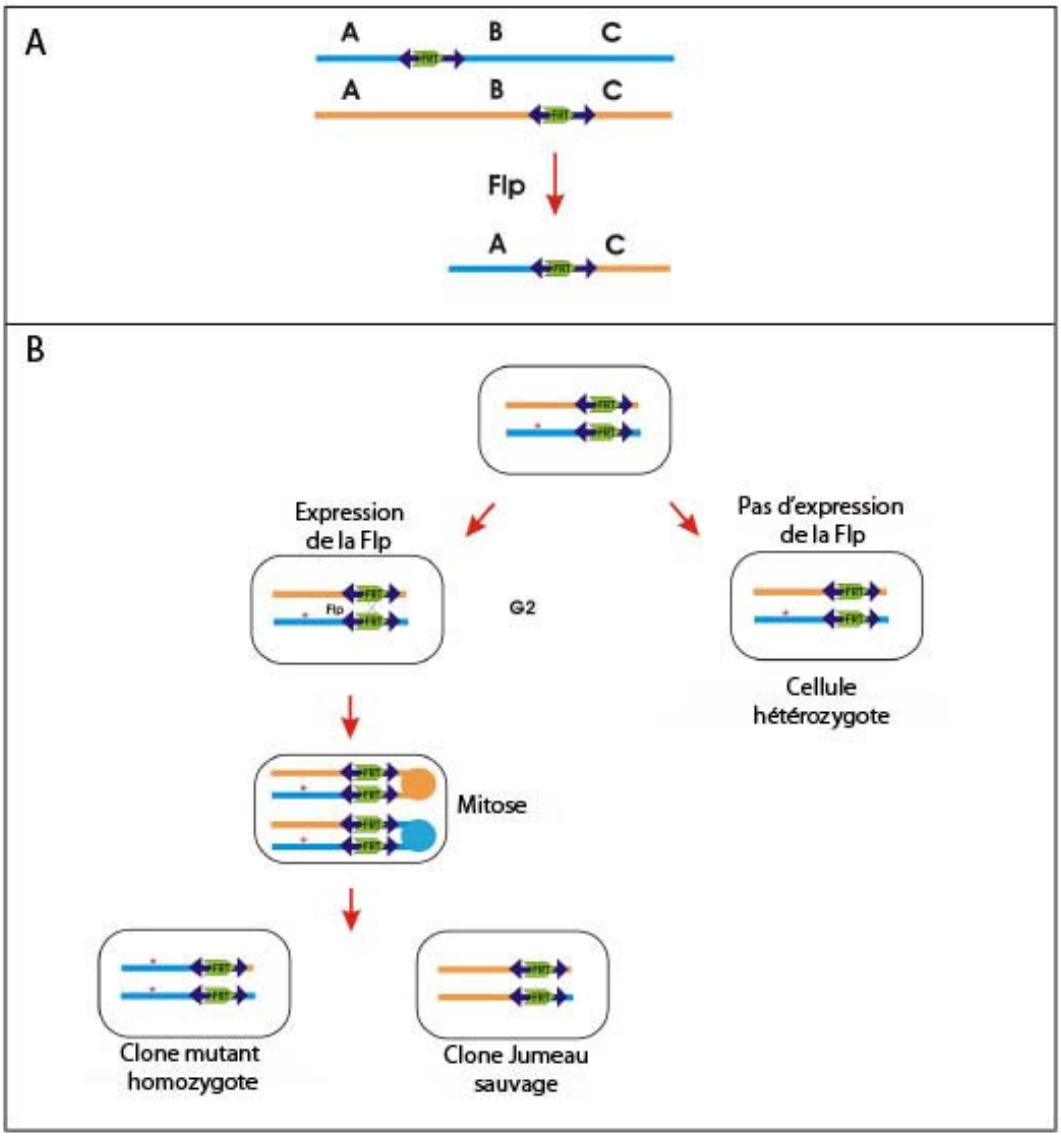
2) Découplage des fonctions de M : ancrée versus diffusible

a) Fonction du domaine transmembranaire

La position du site potentiel de clivage aux Furines entre le domaine ZPD et le DTM de M, suggère que, si forme diffusible il y a, elle devrait ne pas comporter la région transmembranaire et cytoplasmique de M. Nous avons donc testé la fonction *in vivo* d'une protéine M tronquée des régions correspondantes, mimant ainsi une protéine constitutivement clivée à ce site (GFP-MΔC-ter). La surexpression de cette protéine dans un contexte sauvage, ne génère aucune modification de la forme des denticules, montrant que GFP-MΔC-ter n'a pas d'effet dominant sur la fonction de M endogène (figure 35). GFP-MΔC-ter n'est pas capable de restaurer la forme sauvage des denticules d'un embryon mutant m^1, quelque soit le pilote utilisé, *da*Gal4 ou *en*Gal4 (figure 35). Cependant, l'étiquette GFP nous permettra de suivre la localisation de cette protéine, afin d'établir si l'absence de sauvetage est lié à une mauvaise distribution subcellulaire de cette protéine.

b) M ancrée versus M diffusible

Afin de tester l'existence d'un clivage de M *in vivo*, nous avons introduit une double étiquette: une GFP en N-ter et une mCherry en C-ter (figure 36). Ce double marquage fluorescent permet de suivre de manière indépendante les deux régions de la protéine :



<u>Figure 34 :</u> Recombinaison site spécifique par le système FLP/FRT.
A) Création d'une délétion sur le chromosome entre les deux sites FRT. Deux lignées portant des sites FRT localisés à des positions différentes sur le même chromosome sont croisées, puis la flipase (FLP) est induite par choc thermique pour créer la délétion désirée. B) Génération des clones mitotiques. Le chromosome Bleu porte une mutation (astérisque Rouge). Dans ce cas, les sites FRT sont à des positions identiques sur les chromosomes homologues parentaux. La recombinaison induite en phase G2 par la Flp va créer des chromosomes mixtes, qui au cours de la mitose vont ségréger indépendamment. Cela crée des cellules avec les deux bras de chromosome mutés : le clone mutant et des cellules avec les deux bras de chromosome sauvage, le clone jumeau. Le reste de l'individu est composé de cellules (hétrozygotes pour la mutation). (D'après Mátés *et al. Genome Biology* 2007)

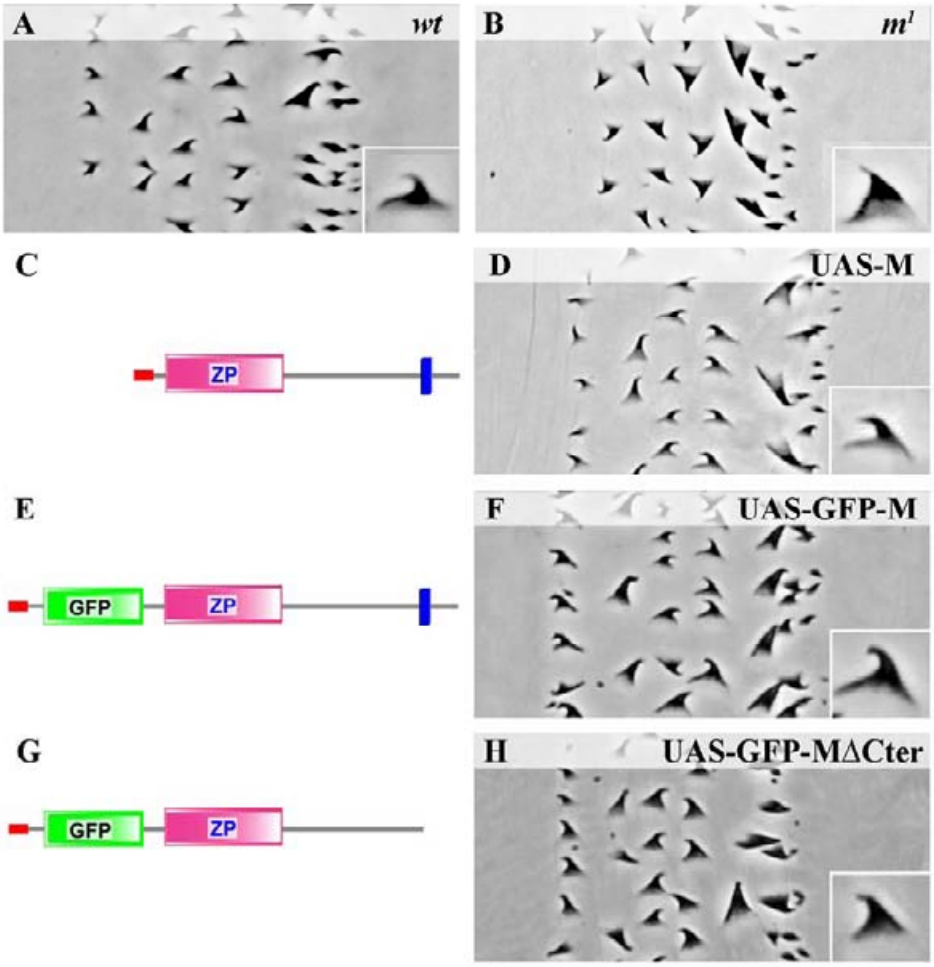
cytoplasmique par la mCherry et extracellulaire par la GFP. Les résultats préliminaires obtenus dans l'épiderme embryonnaire mettent en évidence une différence claire des deux marquages fluorescents, aussi bien à l'échelle cellulaire que subcellulaire (figure 36). Le signal GFP se localise spécifiquement sur les denticules des cellules productrices, mais aussi sur les denticules des cellules postérieures adjacentes. Par contre, le signal m-Cherry n'est détecté que dans les cellules productrices, et de manière punctiforme (figure 36). Ces résultats suggèrent donc que M est clivée et que seule la partie extracellulaire se relocalise sur les denticules. De plus la distribution punctiforme de la partie ancrée pourrait correspondre à des vésicules adressant la protéine vers le domaine apical, ou à des vésicules de recyclage chargées de dégrader la partie intra-cytoplasmique. Il est cependant indispensable de répéter ces expériences et de changer la nature de la détection (en utilisant des anticorps plutôt que les fluorescences endogènes), pour exclure l'existence de biais expérimentaux à cette distribution différentielle des deux régions de la protéine M.

3) Fonction de M chez l'adulte

M est nécessaire à la réorganisation de la forme des cellules épithéliales de l'aile, ainsi qu'à la formation correcte des extensions à leur face apicale. Nous avons profité des outils de génétique moléculaire construits pour initier l'analyse des fonctions de M au cours de la formation de l'aile.

a) Sauvetage et diffusion

Comparée à un individu sauvage, la taille de l'aile est fortement réduite dans le mutant m^1 (figure 37A-C). Ce phénotype est probablement lié à un défaut d'aplatissement des cellules en fin de métamorphose, comme le suggère un défaut de la cuticule qui souligne les contours cellulaires (figure 37D). L'expression, dans le compartiment postérieur, d'un transgène codant une forme sauvage de M restaure largement la taille de l'aile (figure 37E). De plus, cette expression de *m* améliore aussi notablement le compartiment antérieur. A fort grossissement, la différence d'organisation cellulaire est facilement décelable (figure 37F). Les cellules postérieures présentent la taille et toutes les caractéristiques des cellules sauvages, alors que les cellules antérieures montrent encore des défauts résiduels de la cuticule. Toutefois, cette accumulation de bourrelets membranaires à l'apex des cellules antérieures est moins



<u>Figure 35 :</u> Fonction du Domaine TransMembranaire de M.
A-C) Image en contraste de phase de la forme de l'ensemble des 7 rangées de denticules sauvages (A), m^1 (B) et sauvetage par le transgène UAS-*m* (C), UAS-GFP*m* (D) et GFP-MΔC-ter (H). B) Les denticules m^1ont une forme triangulaire sur une base élargie. C) Schéma de la protéine M. En rouge le Peptide Signal (PS) permettant l'adressage, en rose, le domaine fonctionnel ZP et en bleu le domaine transmembraneaire permettant l'ancrage de la protéine à la membrane plasmique. D) Expression de l'UAS-M dirigée par le pilote daG4, qui permet un expression ubiquitaire précoce du transgène. L'ensemble des rangées présente un phénotype sauvage. E) Schéma de la protéine de fusion GFP-M. La GFP, en vert, a été insérée en N-terminal de la protéine, en aval du PS. F) Expression de l'UAS-GFP-M dirigée par le pilote daG4. L'ensemble des rangées présente un phénotype sauvage, démontrant que la GFP ne gène pas la fonction de M. G) Schéma de la protéine GFP-MΔC-ter, ou la protéine a été tronqué en amont de son DTM. H) Expression de l'UAS- GFP-MΔC-ter dirigée par le pilote daG4. L'ensemble des rangées présente un phénotype proche des mutants m^1. Toutefois on remarque une légère modification de la forme des denticules.

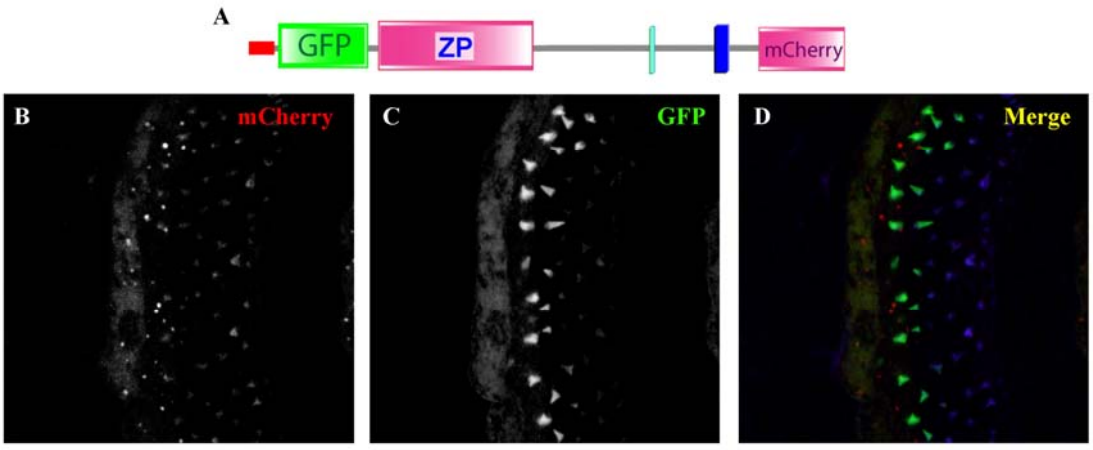
importante que celle observée sur les cellules m^1 (figure 37D-F). Ces résultats démontrent d'une part que le phénotype m^1 observé dans l'aile est bien lié à la perte de fonction de *m*, et d'autre part que la protéine M agit de façon cellulaire non autonome (au moins en partie) également dans ce tissu. Nous avons alors reproduit au cours de la morphogenèse alaire le même type d'expériences que celles utilisées pour l'épiderme embryonnaire.

b) Fonction du domaine transmembranaire

L'expression de GFP-MΔC-ter dans le compartiment postérieur est incapable de restaurer une taille d'aile correcte, démontrant que la fonction ancrée de M est requise au cours de la morphogenèse de l'aile. Toutefois, une légère augmentation de la taille du compartiment postérieur est constatée, montrant que cette protéine diffusible n'est pas dénuée de toute fonction (figure 37I). En effet, les défauts observés au niveau cellulaire sont visiblement atténués, montrant que cette protéine extracellulaire compense partiellement l'absence du produit M endogène (figure 37J).

L'étiquette GFP nous permettra de suivre la localisation de cette protéine pour la comparer à celle de la protéine sauvage (endogène ou GFP). Hélène Chanut a débuté cette analyse et ses premiers résultats suggèrent que M pourrait diffuser depuis sa source d'expression et se localiser spécifiquement à la face apicale des cellules réceptrices (figure 38A). Des images similaires sont obtenues pour la protéine GFP-MΔC-ter (figure 38B). Enfin, l'étude de la protéine doublement étiquetée, GFP-M-mCherry montre que les deux signaux présentent une distribution différentielle, compatible avec un clivage de la protéine (figure 38C).

Les résultats de cette première étude semblent encourageants et suggèrent que l'épithélium alaire est bien adapté à l'analyse fonctionnelle des protéines ZPD. Si nous montrons une diffusion de la protéine M, l'existence d'un clivage reste encore à être établie. Les outils que nous avons générés devraient permettre de répondre sans ambiguïté à cette question. Nous espérons ainsi à terme contribuer à mieux comprendre les fonctions générales (et/ou spécifiques) des protéines ZPDs pour la morphogenèse.



<u>Figure 36 :</u> Localisation de la protéine GFP-M-mCherry permettant de visualiser les parties N-terminale et C-terminale de la protéine M.

A) Schéma de la protéine M où la GFP a été insérée en N-erminal entre le PS et le domaine ZP et la mCherry en C-terminal, après le DTM. L'expression du transgène est dirigée par enG4. Image en microscopie confocale du segment A3. B) Localisation de la partie C-ter de M grâce à la mCherry. La protéine se localise dans le cytoplasme en rangée 0 et de manière punctiforme dans les première rangées de denticules (1 à 3). La mCherry est aussi visible dans les denticules des rangées suivantes (4à 5). C) Localisation de la partie N-ter grâce à la GFP. La protéine se localise dans le cytoplasme en rangée 0 et sur les denticules des trois premières rangées. D) Superposition des images B et C, plus coloration de la F-actine en bleu.

DISCUSSION

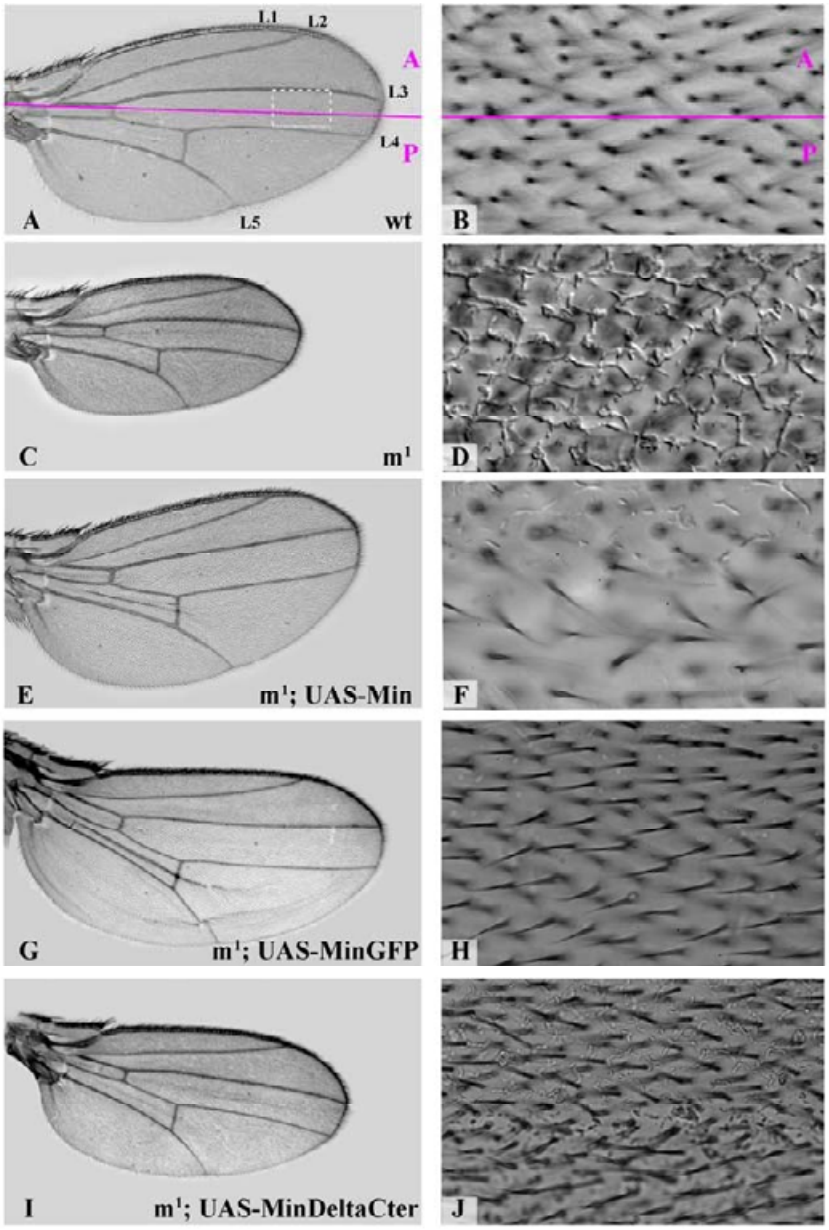
Nos résultats montrent que la protéine M est capable d'agir à distance des cellules qui l'expriment (effet cellulaire non-autonome), dans l'épiderme embryonnaire, et aussi dans l'épithélium de l'aile adulte. De plus, nos expériences montrent clairement que la protéine M peut diffuser vers les cellules adjacentes à celles qui la produisent, et se localiser spécifiquement dans les extensions apicales. Ces résultats inattendus semblent difficiles à réconcilier avec ceux montrant que l'ancrage à la membrane de M est requis pour sa fonction. L'analyse ultrastructurale montre en effet que M est nécessaire au maintien du contact entre la membrane et la cuticule dans l'épiderme embryonnaire (Chanut-Delalande et al., 2006), et possiblement aussi dans les ailes adultes (Roch et al., 2003).

Comment une protéine nécessaire au lien entre la membrane et la cuticule peut-elle agir à distance ?

L'une des caractéristiques de la famille des protéines ZPD est la présence d'un site potentiel de clivage aux Furines évolutivement conservé, mais dont le rôle reste à élucider (Zhao et al., 2002). Pour étudier l'importance de l'ancrage de M, nous avons généré une protéine uniquement diffusible, GFP-MΔC-ter, tronquée du domaine transmembranaire (DTM) et la partie intra-cytoplasmique. Nous montrons que cette protéine extracellulaire ne remplit que partiellement les fonctions de M, suggérant que l'ancrage de la protéine par son DTM est nécessaire à son activité.

D'autres protéines ZPD pourraient contribuer au maintien du contact membrane/cuticule dans l'aile, incluant Pio, Dy, Dp et Cyr dont la fonction et/ou l'expression a été établie dans les cellules de l'aile au cours de la métamorphose. Par une association semblable à celle de ZP1,2 et 3 dans la *Zona Pellucida* (Greve and Wassarman, 1985; Jovine et al., 2002), les protéines ZPD de drosophile pourraient former des fibres intégrées à la cuticule de l'aile. Il est possible que ces interactions potentielles puissent contribuer à la distribution spécifique de la moitié extracellulaire des ZPD, même en absence d'ancrage membranaire.

Les résultats obtenus avec la protéine extracellulaire GFP-MΔC-ter suggèrent que cette protéine diffuse avec son DTM, car il semble indispensable à sa fonction. Donc si M est clivée pour être intégrée dans la procuticule, une autre fraction des protéines M doit être (au moins transitoirement) ancrée à la membrane. Pour analyser le devenir des deux parties de la



<u>Figure 37 :</u> Sauvetage phénotypique des mutants *m[1]* dans l'aile adulte.
A, C, E, G et I) Photos d'aile adulte. B, D, F, H et J) Grossissement de la région internervure L3-L4 (Cadre figure A). A-B) Aile sauvage. La limite A/P est illustrée par le trait rose. B) Les contours cellulaires ne sont pas visibles, seul les poils sont discernables. C-D) Aile m^1. Réduction de la taille de l'aile (comparer A et C). D) Les contours cellulaires sont rendus visibles par l'accumulation de la cuticule. E-F) L'UAS-M piloté par enG4 est exprimé uniquement dans le compartiment postérieur. La taille de l'aile est restaurée (comparer A et E). F) Les cellules postérieures présentent une taille et toutes les caractéristiques des cellules sauvages, alors que les cellules antérieures ont un phénotype intermédiaire. G-H) L'UAS-GFP-M restaure un phénotype de taille de l'aile correcte (comparé A et G). H) Le sauvetage est identique à celui observé pour le transgène UAS-M. I-J) Expression de l'UAS- GFP-MΔC-ter par le pilote enG4. I) La taille de l'aile est intermédiaire entre celles des mutants *m[1]* et sauvage (comparer A, C et I). J) Les défauts cellulaires partiels restent identifiables quel que soit le compartiment observé.

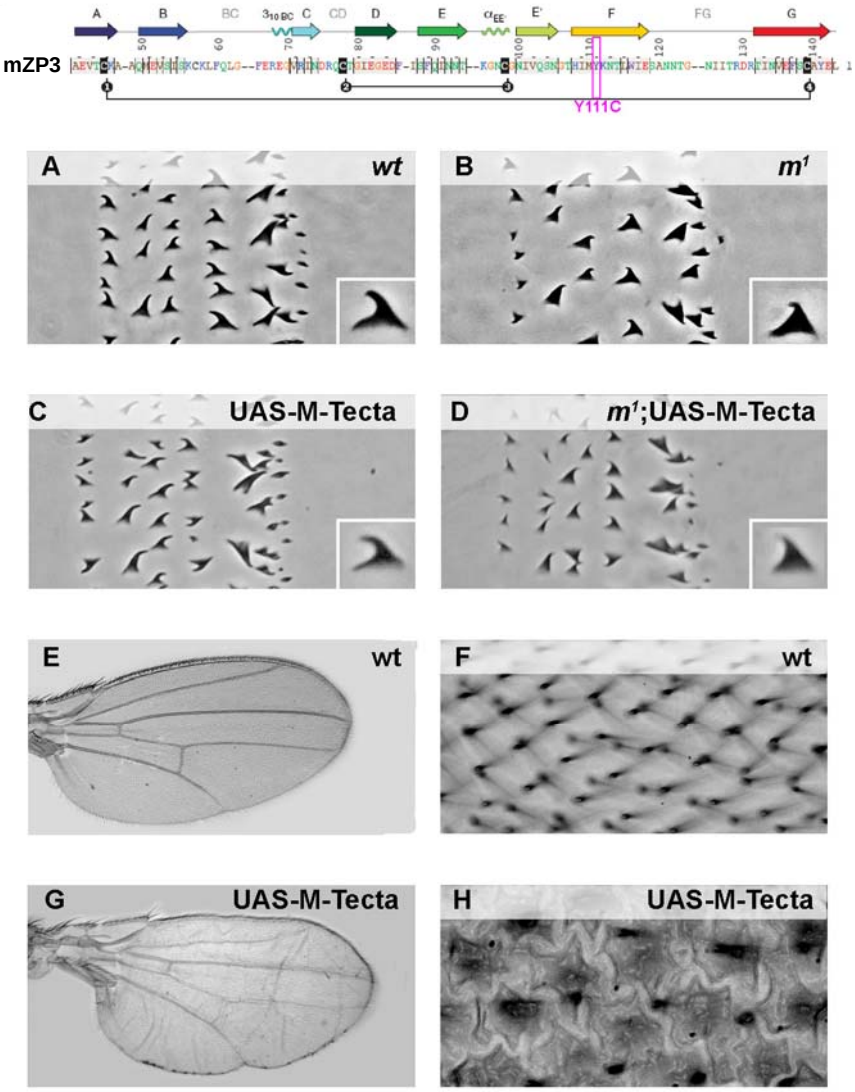
protéine M, nous avons construit une protéine doublement étiquetée, GFP-M-mCherry. Dans l'aile, la partie diffusible (GFP) est décelable dans le cytoplasme des cellules productrices et va s'accumuler spécifiquement à leur face apicale. La partie ancrée (mCherry) est elle aussi visible dans le cytoplasme mais son accumulation à la face apicale est punctiforme et sur une distance plus courte, suggérant un marquage vésiculaire (figure 38). La protéine pourrait être adressée via un transport vésiculaire dans les cellules voisines, qui la dirigerait ensuite vers leur compartiment apical. Ce transport, ou transcytose, serait rendu possible grâce à des vésicules, comme les argosomes, à la membrane desquelles M serait ancrée. Ce type d'adressage a initialement été suggéré pour le transport et la formation du gradient de Wg dans les disques d'aile (Greco et al., 2001). Les argosomes sont formés à partir de la membrane basolatérale et voyagent à travers le tissu épithélial. Le marquage que nous observons pour la partie intracellulaire de M est assez similaire à celui formé par les vésicules Wg. Il est donc possible que M soit transportée d'une cellule à l'autre sous sa forme pleine taille, pour être ensuite redirigée à la surface apicale, et éventuellement clivée. Ces hypothèses devront être testées par des approches expérimentales adaptées.

Pour confirmer que la partie intracellulaire est associée à des vésicules, il faudra effectuer des co-détections avec les marqueurs des différentes vésicules de sécrétion et de recyclage vers et depuis l'apical. Hélène Chanut analyse actuellement la localisation de M dans des contextes mutants pour différentes protéines impliquées dans le trafic vésiculaire. Nos premiers résultats montrent que syntaxin 1A (Syx1A), une protéine T-SNARE, n'est pas impliquée dans l'adressage de M, ni dans celui de Tyn ou Dyl, dans l'épiderme embryonnaire (figure 30). Toutefois, nous avons vu que la petite taille de ces cellules rend difficile l'étude des mécanismes d'adressage des protéines ZPD. L'aile pourrait être un système plus adapté pour répondre à ces questions.

M est donc probablement adressée aux cellules voisines via un transport vésiculaire, qu'il reste encore à définir. De plus, dans les cellules non productrices M est capable de se localiser spécifiquement dans l'extension cytoplasmique, suggérant un transport orienté ou une interaction protéine spécifique.

Quel est le rôle de la région N-terminale du domaine ZP au cours de la morphogenèse ?

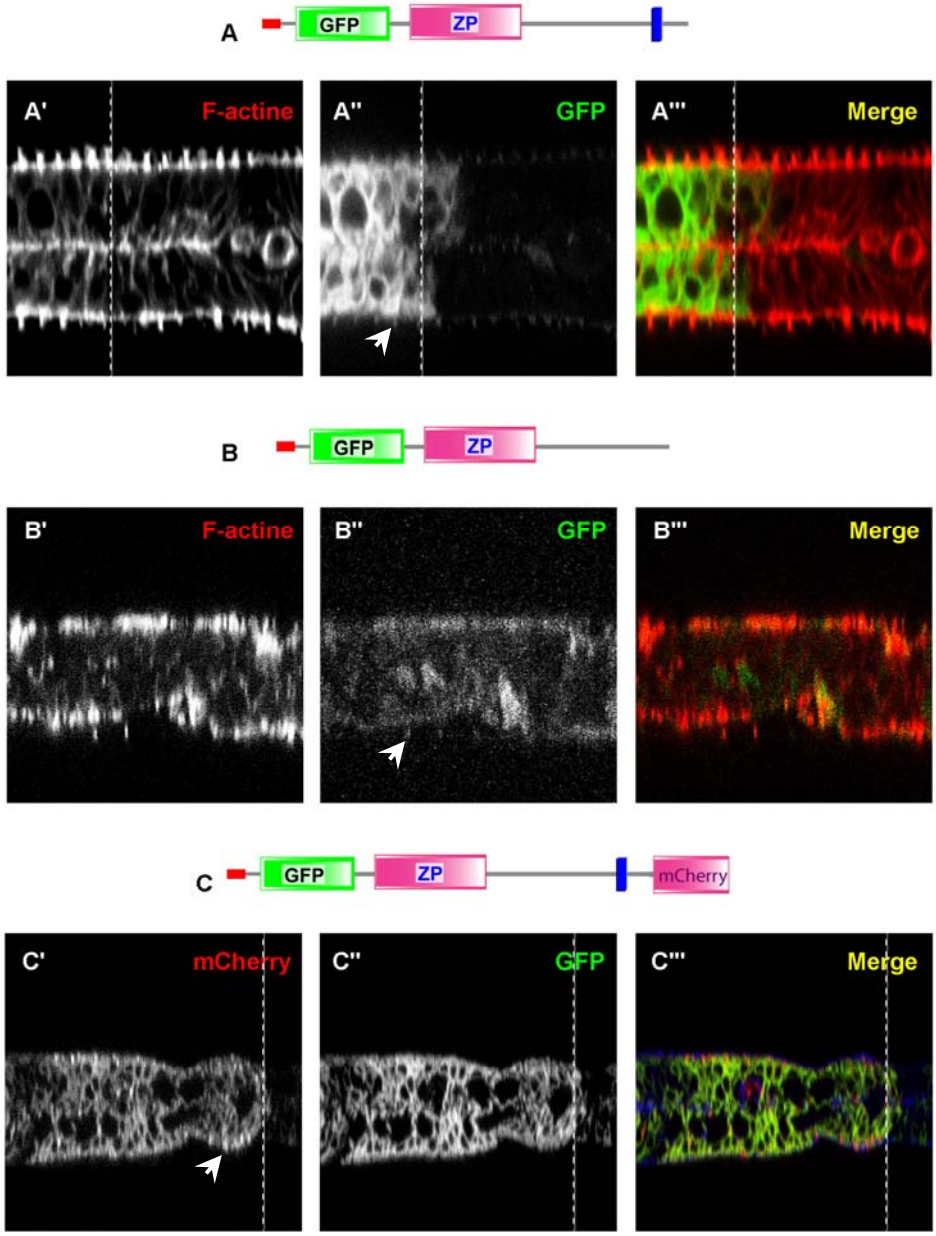
Nous avons vu que M est capable après avoir diffusé de se localiser spécifiquement où sa fonction est requise. M pourrait une fois dans l'espace matriciel extérieur, se fixer via son



<u>Figure 39 :</u> Fonction de la région N-terminale du domaine ZP de M (ZP-N).
Structure de l'hémi-domaine ZP-N de ZP3. Les flèches représentent les feuillets β, avec une couleur allant du bleu (N-terminal) vers le rouge (C-terminal). Les quatre cystéines sont dans un cadre noir et numérotées de 1 à 4. Les crochets matérialisent les ponts disulfures établis au cours de la structuration tridimensionnelle de la protéine. Le cadre rose montre l'emplacement de la mutation ponctuelle Y111C. Dans la protéine M, cette mutation correspond à la substitution Y117C, et la protéine mutante est nommée M-Tecta. A-C) Rangées de denticules sauvages (A), m^1 (B) et surexpression (C) ou sauvetage par le transgène *UAS-M-Tecta* (D). C) Surexpression du transgène UAS-Tecta. La protéine M-Tecta n'a aucun effet dans un contexte sauvage. D) Sauvetage la mutation m^1 par l'UAS-Tecta. L'expression de M-Tecta n'est pas capable de sauver le phénotype m^1. E-H) Photos d'aile adulte. F et H) Grossissement de la région internervure L3-L4. E) Aile sauvage. G) La surexpression du transgène dans un contexte sauvage a un effet dominant négatif dans la morphogénèse. L'aile est légèrement plus petite et montre un aspect « froissé ». H) Les contours cellulaires sont visibles par l'accumulation de matériel apical mais les cellules montrent une forme étoilée différente de la forme hexagonale des cellules m^1. Ce phénotype suggère que les cellules épithéliales ont étendu leur surface mais pas de façon optimale.

domaine ZP à d'autres protéines ZPD. Les données sur ZP3 montrent que la sous-région N-terminale du domaine ZPD (ZP-N) est capable de se structurer indépendamment du reste du domaine ZP. Cette structure tridimensionnelle du ZP-N est suffisante pour former des filaments par homo-polymérisation (Jovine et al., 2006). Il existe d'ailleurs des protéines ne possédant que cette moitié N-terminale du domaine ZPD, suggérant une fonction « intrinsèque » de la sous-région ZP-N (Bokel et al., 2005).

Nous avons voulu tester l'effet d'une mutation ponctuelle de cette sous-région ZP-N, sur l'activité *in vivo* de la protéine M. Chez l'homme, l'α-Tectorine est l'un des composants de la membrane tectoriale, une matrice extracellulaire recouvrant les cellules de l'oreille interne. Une mutation remplaçant une tyrosine (Y) par une cystéine (C) dans le domaine ZP-N, Y1870C, est associée à un syndrome de surdité congénitale (Legan et al., 1997). Chez la souris, la mutation Y1870C altère l'assemblage des filaments de α/β-tectorine et provoque une réduction de l'épaisseur de la membrane tectoriale (Legan et al., 1997). Récemment, cette mutation à été introduite dans le ZP-N de ZP3 (Y111C). Elle entraîne une réduction de la solubilité de cette protéine *in vitro*, ainsi qu'une diminution de sa sécrétion dans des cellules *ex vivo* (Monne et al., 2008). Nous avons introduit la mutation correspondante (Y117C) dans le ZP-N de la protéine M, et testé la fonctionnalité de cette protéine modifiée, M-Tecta. M-tecta est incapable de compenser l'absence de M endogène, montrant l'importance fonctionnelle du sous-domaine ZP-N *in vivo* (figure 39D). L'expression de M-tecta dans les cellules de l'aile sauvage provoque un effet dominant négatif, générant des défauts de la cuticule des cellules épithéliales (figure 39G). Des « bourrelets cuticulaires » ectopiques soulignent le pourtour des cellules, comme observé dans les mutants m^1 (figure 39H). Toutefois, le périmètre très irrégulier des cellules, suggère que M-Tecta n'empêche pas l'augmentation de leur surface apicale au cours de leur morphogenèse, ou en tout cas à un stade plus tardif qu'en absence de fonction *m.* De manière intéressante, le phénotype résultant de l'expression de M-tecta dépend du rapport de son niveau d'expression vis à vis de celui de la protéine endogène, suggérant que cette protéine mutante Y133C entre en compétition avec le produit endogène. L'analyse structurale du domaine ZP-N Y111C montre qu'un pont disulfure supplémentaire est formé entre la C111 et la C139 (Monne et al., 2008). Il est donc possible que la protéine M-Tecta présente aussi des défauts de conformation gênant l'interaction de ce domaine avec d'autres protéines de la matrice, incluant peut-être la forme normale de la protéine M.



<u>Figure 38 :</u> Localisation cellulaire de la protéine M dans les ailes pupales.
Image en microscopie confocale d'une section d'aile pupale entre 40 et 60 heures APF. Les transgènes sont dirigés par enG4, limitant leur expression au domaine postérieur, à droite du trait en pointillé blanc. A') Coloration de la F-actine par la phalloïdine-rhodamine. A'') Localisation de M grâce à la GFP. La protéine M se localise dans le cytoplasme et s'accumule à la face apicale des cellules productrices (pointe de flèche). Dans le compartiment antérieur, la protéine n'est visible que sur la face apicale des cellules. A''') Superposition des images A' et A''. B') Coloration de la F-actine par la phalloïdine-rhodamine. B'') Localisation de M grâce à la GFP. La protéine GFP-MΔC-ter mime une forme diffusible et s'accumule à la face apicale des cellules (pointe de flèche). Dans ce cas, il est difficile d'identifier les cellules productrices. B''') Superposition des images B' et B''. C') La mCherry est localisée dans le cytoplasme des cellules productrices avec une accumulation punctiforme à la surface des cellules. Dans le compartiment antérieur la partie C-ter se localise préférentiellement à l'apex des cellules (pointe de flèche). C'') La partie N-ter visible grâce à la GFP, se localise dans le cytoplasme des cellules productrices et à la face apicale des cellules de l'antérieur. B''') Superposition des images B' et B'', plus coloration de la F-actine en bleu.

La double fonction, ancrée et diffusible, est-elle spécifique de M ?

Il serait utile pour la compréhension des mécanismes d'adressage et de régulation des protéines ZPD de tester, si comme M, Tyn est capable d'agir à distance. Pour cela, nous pourrons observer la localisation de la protéine de fusion GFP-Tyn, lorsque le transgène correspondant est exprimé sous le contrôle du pilote *en*G4 dans l'épiderme embryonnaire. Des expériences préliminaires suggèrent que Tyn est en fait incapable de diffuser dans ce contexte. Nous envisageons pour compléter cette étude de construire une protéine de fusion GFP-Dyl, afin de déterminer si cette fonction diffusible est spécifique de M.

Une éventuelle fonction de Tyn et/ou Dyl au cours de la morphogenèse de l'aile reste aussi à établir. Les premières immunocolorations, réalisées par Hélène Chanut, montrent une distribution préférentielle dans différentes régions du compartiment membranaire apical des protéines Tyn et Dyl dans les cellules épithéliales des ailes pupales (figure 40). Il est donc possible que ces protéines ZPD collaborent fonctionnellement avec M pour le remodelage de la forme des cellules de l'aile. La surexpression de Dyl ou de Tyn ne compense pas l'absence de *m* pour la morphogenèse de l'aile, suggérant qu'il existe, dans ce tissu aussi, une spécificité fonctionnelle de chaque protéine vis-à-vis de la réorganisation morphologique du compartiment apical.

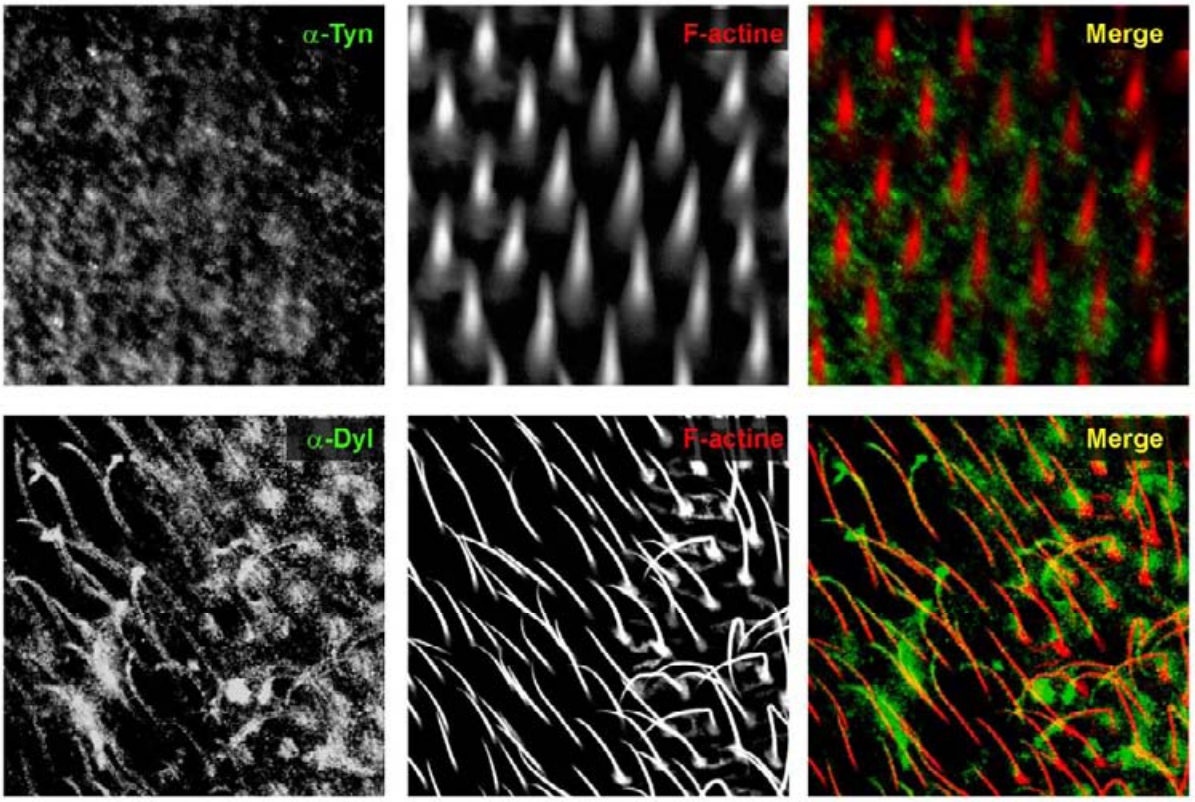


Figure 40 : Localisation des protéines Tyn et Dyl dans les ailes pupales.
Image en microscopie confocale de la surface d'une aile pupale entre 40 et 60 heures APF. Coloration de la F-actine en rouge et immunocoloration de Tyn ou Dyl en vert. Tyn se localise à la surface apicale des cellules épithéliales avec une accumulation préférentielle à la base des poils naissants. Dyl s'accumule à la base du poil naissant, mais aussi tout autour des poils.

CONCLUSION et PERSPECTIVES

Cette discussion va s'articuler selon trois axes. Le premier concerne une réflexion autour de ce que nous avons appris des mécanismes de contrôle de l'expression génique dans le cas de la différenciation terminale. Le deuxième concerne la régulation par un même facteur de transcription de différents processus tout au long du développement. Enfin, nous terminerons par les éventuelles perspectives qu'ouvre notre travail pour la compréhension des fonctions *in vivo* des protéines ZPD, dont les altérations sont responsables de maladies génétiques graves chez l'Homme.

1. Régulation transcriptionnelle de la différenciation terminale

Malgré l'importance évidente de la régulation de l'expression des gènes au cours du développement, la nature intime des mécanismes impliqués reste étonnamment mal connue. Par exemple, des gènes cibles ont été identifiés pour moins d'une cinquantaine de facteurs de transcription chez la Drosophile (dont le génome contient plus de 700 gènes codant des facteurs de transcription). Les arguments expérimentaux d'un contrôle direct, notamment l'identification des CRM impliqués, sont encore plus pauvres. Ainsi, il faut rappeler que les mécanismes moléculaires du contrôle de l'expression des gènes au cours du développement, et plus encore dans les étapes de différenciation terminale (incluant la morphogenèse), restent essentiellement à découvrir aujourd'hui.

Comment, parmi l'ensemble des motifs de liaison potentiels présents au sein du génome, un facteur de transcription identifie-t-il les sites fonctionnels, dans un tissu donné ?

Pour le facteur de transcription Svb, la séquence reconnue est aCnGTTaca, dont les lettres capitales représentent les nucléotides invariants (Garfinkel et al., 1994). Un calcul simple prédit l'existence de plus de 10 000 sites potentiellement reconnaissables par ce facteur, soit un motif au voisinage de chaque gène. Nos résultats montrent que Svb ne régule l'expression « que » d'une centaine de gènes impliqués dans la différenciation des cellules épidermiques embryonnaires. Nous montrons un enrichissement significatif des sites de liaison Ovo/Svb dans les gènes cibles de Svb, quel que soit le standard choisi (autres gènes épidermiques indépendant de Svb, ou l'ensemble des gènes de la Drosophile). Paradoxalement, nous ne détectons pas de vrai « clustering » de sites dans les régions génomiques des gènes cibles de Svb. Nous montrons que de courtes séquences de 200bp à 1kb, déplacées de leur contexte chromatinien endogène, suffisent à diriger fidèlement l'expression *svb* dépendante d'un gène

rapporteur dans les cellules épidermiques à trichomes. Cet enrichissement de sites de liaison à l'échelle du locus n'est donc pas indispensable à l'activité des CRM répondants à Svb.

Une autre idée répandue est que le profil de conservation évolutif (evolutionary footprinting) aide à discriminer les sites de liaison fonctionnels au sein des régions potentiellement cis-régulatrices. Pourtant, les motifs identifiés dans une région génomique présentant une forte conservation se sont généralement révélés inactifs dans nos analyses. Cependant il est important de rappeler les limites d'ordre technique concernant la qualité du séquençage des régions non-codantes, très variable selon les douze espèces de Drosophile. De plus, les algorithmes de recherche de conservation évolutive sont basés sur des approches initialement développées pour l'analyse des régions codantes, qui font l'hypothèse initiale de l'importance de la colinéarité des régions homologues. En effet, l'ordre respectif et la distance entre les sites de fixation peuvent varier de manière importante (Hare et al., 2008). En résumé, nous avons montré ici que : i) les gènes cibles de Svb sont caractérisés par une accumulation de motifs potentiels de liaison Ovo/Svb, ii) ces sites sont dispersés à travers les régions non codantes de chaque locus, iii) leur profil de conservation évolutive ne permet pas de discriminer les sites fonctionnels au cours de l'embryogenèse.

Existe-t-il d'autres motifs nucléotidiques déterminant l'utilisation in vivo d'un site de liaison donné ?

Nous nous sommes alors intéressés aux autres motifs significativement enrichis dans les gènes cibles de Svb. En plus du site Ovo/Svb, nous retrouvons des motifs correspondants au site de fixation du facteur de transcription Grainy-Head (Grh), qui joue un rôle important dans la différenciation épidermique (Mace et al., 2005; Narasimha et al., 2008). Cependant, ce modèle (OG) s'avère peu discriminant pour la prédiction des CRM. D'autre part, l'inactivation de *grh* ne modifie pas l'expression des gènes cibles de Svb, ou de leurs CRM, dans les cellules à trichomes.

Nous avons alors recherché par des méthodes statistiques l'existence de motifs nucléotidiques spécifiques de ces régions fonctionnelles en comparant les régions transcriptionnellement actives à celles restant inactives. Cette analyse propose une signature des CRM actifs composée par la présence simultanée : d'un site Ovo/Svb, d'un motif correspondant au site de fixation du facteur de transcription c-Myb, et d'un motif nucléotidique orphelin (modèle OMM). De plus, l'analyse des délétions systématiques d'un

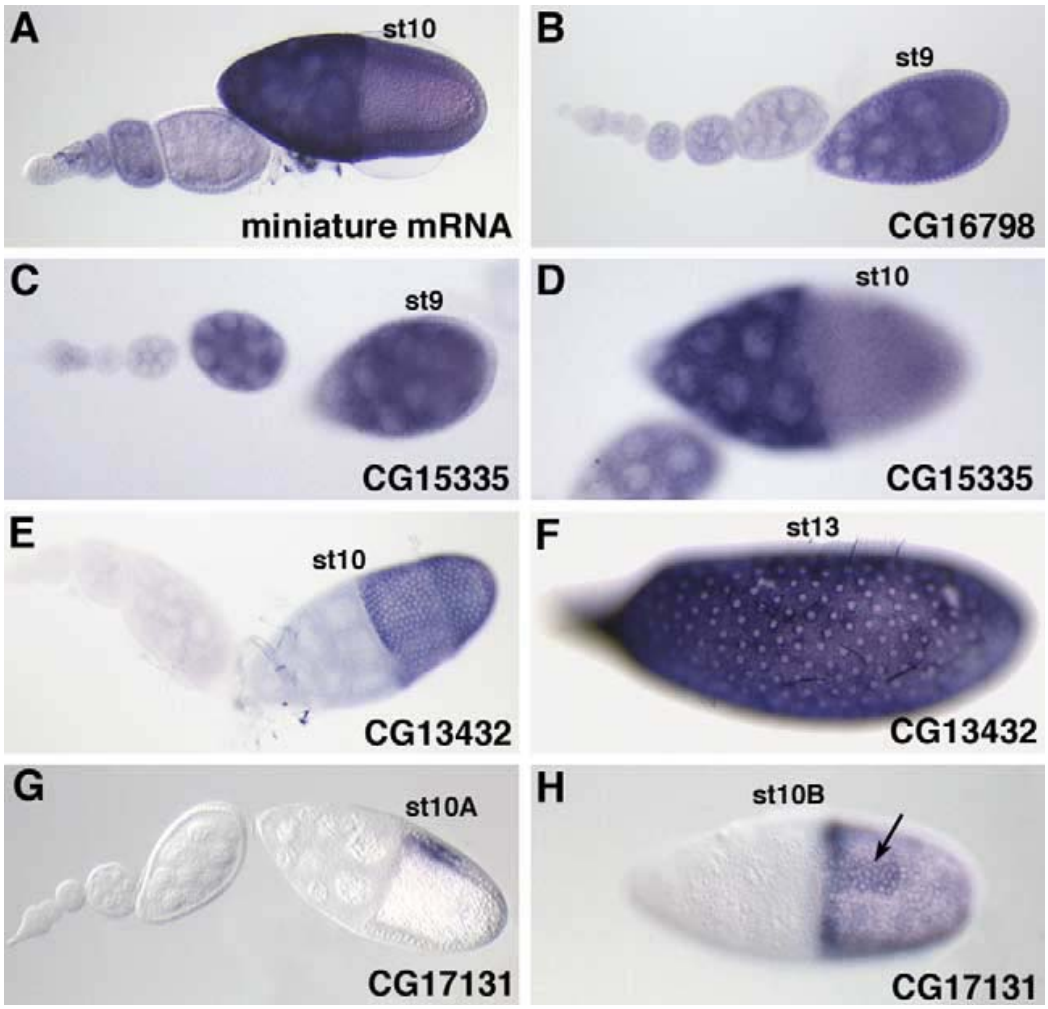
CRM de *m* montre une bonne correspondance entre ces motifs prédits et l'influence fonctionnelle de leur délétion (communication personnelle Serge Plaza). La recherche d'un facteur éventuellement associé au motif orphelin représente un challenge expérimental, qui pourra être entrepris ultérieurement. Nos analyses illustrent l'intérêt d'une interaction étroite entre les analyses comparatives prédictives et les tests fonctionnels.

De manière générale, nos résultats établissent déjà que les mécanismes de régulation de l'expression des gènes de différenciation terminale, au moins dans notre cas, utilisent des stratégies différentes de celles déjà bien décrites pour la régulation de l'expression des facteurs de transcription responsables de la segmentation. Le modèle général que nous proposons est celui de CRM compacts, parfois dispersés à l'intérieur du même gène, et construits autour d'un regroupement hétérotypique de sites non ordonnés les uns vis-à-vis des autres. Nos travaux contribuent donc à une vision plus large des paradigmes de la régulation transcriptionnelle et définissent les nouvelles directions à explorer.

2. Des modules de différenciation sont-ils réutilisés au cours du développement ?

Il est bien établi que les mêmes régulateurs (facteur de transcription, voies de signalisation) présentent une expression spécifique dans différents tissus et/ou à différentes étapes du développement. Un facteur de transcription donné et ses gènes cibles pourraient donc définir un module fonctionnel, impliqué dans la spécification des différents tissus au cours du développement. Ainsi, l'expression d'un facteur de transcription déclencherait une routine transcriptionnelle capable d'activer l'ensemble de ses cibles. Au contraire, le contexte cellulaire (*e.g.*, le paysage trans-régulateur et épigénétique) pourrait être déterminant et permettre au même facteur de transcription de déclencher l'expression de différentes cibles en fonction du tissu observé. Là encore, notre compréhension de ces phénomènes reste pour le moins lacunaire. Nous développerons ici en quoi nos travaux peuvent contribuer à fournir des outils intéressants pour aborder ces questions générales.

La comparaison des mécanismes de la morphogenèse cellulaire entre l'épiderme embryonnaire et l'épithélium alaire (qui va se différencier au cours de la métamorphose pour rapidement dégénérer chez l'adulte) nous offre un modèle d'étude intéressant. Le statut d'expression de *svb*, ainsi que le rôle que ce facteur pourrait jouer dans le processus de



<u>Figure 41 :</u> Expression des gènes ZPD au cours de l'ovogénèse.
CG15335 correspond à *cypher* et CG17131 à *trynity*. Les chiffres correspondent au stade (st) des chambres à œuf observées. La flèche dans l'image H montre une expression de *tyn* renforcée dans les cellules folliculaires antéro-dorsales proches du noyau de l'ovocyte. (Jazwinska et al., 2004).

morphogenèse, reste cependant à préciser (Delon et al., 2003). En plus de *m* (Roch et al., 2003), les gènes *y, sn, f, sha* et les gènes ZPD *pio, dy, dp, pot* et *cyr* sont requis pour la différenciation de l'aile (Bokel et al., 2005; Prout et al., 1997). Des données quantitatives montrent aussi que l'expression des gènes *m, dy, cyr* et *dyl* est fortement activée au cours de la morphogenèse de l'aile pupale (Ren et al., 2005). Notre étude préliminaire de la fonction des protéines ZPD dans l'aile, montre que la surexpression de Dyl, Tyn, Cyr ou Pio ne peut compenser l'absence d'activité de *m*, montrant qu'il existe une spécificité fonctionnelle de ces protéines, aussi, dans la morphogenèse de l'aile (résultats non présentés). En parallèle de l'étude fonctionnelle des gènes ZPD, il sera intéressant d'étudier leur régulation dans l'épithélium alaire. Nous pourront utiliser l'ensemble des outils construits (mutants, UAS, anticorps, CRM, ...) pour analyser dans ce modèle la conservation éventuelle d'un module régulateur de la morphogenèse cellulaire, commun à ces deux étapes du développement.

Le gène Ovo/Svb est connu pour son double rôle : la différenciation épidermique embryonnaire d'une part et l'établissement de la lignée germinale d'autre part. Nous avons vu que ces deux fonctions correspondent à des promoteurs indépendants générant à des isoformes protéiques et partageant le domaine de fixation à l'ADN. Les protéines OvoB et OvoA présentent une activité respectivement activatrice ou répressive de la formation des denticules quand elles sont exprimées artificiellement dans l'épiderme embryonnaire, montrant qu'elles peuvent réguler les gènes cibles de Svb (Andrews et al., 2000; Chanut-Delalande et al., 2006; Payre et al., 1999). Notre définition fonctionnelle des sites de liaison de Svb sur ses CRM dans l'épiderme confirme que Svb reconnaît bien le même site consensus de fixation que les protéines Ovo. Là encore nos outils devraient permettre de mieux comprendre les principaux paramètres de la spécificité de réponse aux facteurs Ovo/Svb en fonction des tissus.

En effet, plusieurs cibles de Svb dans l'épiderme sont exprimées dans la lignée germinale. *Singed* est bien connu pour ces fonctions ovariennes et l'inactivation de ce gène provoque une stérilité femelle, due à un défaut d'organisation du cytosquelette d'actine dans les cellules nourricières (Cant et al., 1994). Certains des gènes ZPD cibles de Svb sont aussi exprimés dans les ovaires (figure 41). *m* et *cyr* sont exprimés tout au long de l'ovogenèse dans les cellules folliculaires et la lignée germinale, alors que *tyn* est spécifique des cellules folliculaires (Jazwinska and Affolter, 2004). Deux gènes ZPD supplémentaires sont exprimés dans les ovaires, CG13432 dont le profil est identique à celui de *tyn* et CG16798 plus proche

de *m* et *cyr* (Jazwinska and Affolter, 2004). Historiquement, les protéines ZPD ont été identifiées comme étant les composants majeurs de la *Zona Pellucida* des ovocytes mammifères (Wassarman, 1988). Les protéines ZP 1, 2 et 3 forment une matrice extracellulaire protégeant l'ovocyte et jouent le rôle de récepteur espèce-spécifique pour le spermatozoïde (Howes et al., 2001). Chez la Drosophile, il existe différentes enveloppes entourant l'embryon, incluant la membrane vitelline et le chorion (Margaritis, 1985). La composition de la membrane vitelline est assez mal connue et seules quatre petites protéines riches en proline ont été identifiées. Ces protéines sV17, sV23, VM32e et VM34C sont caractérisées par la présence d'un domaine fonctionnel de 38 acides aminés fortement conservé (Manogaran and Waring, 2004), le domaine VM (pour en revue (Waring, 2000)). On ne connaît qu'une quinzaine de gènes codant des composants structuraux du chorion, notamment un cluster de gènes codant des protéines apparentées entre elles (Orr-Weaver, 1991). Si l'hypothèse d'un rôle éventuel des protéines ZPD dans la structure et/ou la fonction des enveloppes de l'œuf d'insectes est attractive, elle reste entièrement à tester. De manière intéressante, au cours de son stage de Master-1, Emilie Benrabah a pu établir que les femelles mutantes m^1 présentent une forte réduction de leur fertilité.

Si certaines cibles des facteurs Ovo ont déjà été identifiées (Lu et al., 1998), comme le gène *otu* ou *ovo* lui-même, aucune étude systématique n'a encore été entreprise. La combinaison d'approches *in silico* et *in vivo* que nous avons développé pour l'épiderme pourrait permettre d'identifier de nouveaux gènes cibles d'Ovo. Contrairement au modèle que nous proposons pour les CRM épidermiques, Ovo régule ses cibles par des éléments contenant plusieurs sites de liaison regroupés en cluster autour du site d'initiation de la transcription (Lu and Oliver, 2001). Il a été proposé que ce clustering soit important pour intégrer la dose de facteur Ovo, notamment au moment de la détermination du sexe de la lignée germinale (Lu and Oliver, 2001). Ainsi, bien que les facteurs Ovo *versus* Svb puissent se substituer l'un à l'autre quand ils sont artificiellement exprimés (au moins dans l'épiderme embryonnaire), leur mode de reconnaissance des CRM dans leur tissu endogène respectif semble être différent. Au cours de son stage de Master-1, Emilie Benrabah a testé une éventuelle expression ovarienne des CRM épidermiques que nous avons identifiés. Aucun d'entre eux n'a donné d'expression spécifique dans les ovaires, montrant qu'ils ne sont pas reconnus par la protéine Ovo dans ce contexte. Par contre, Emilie a montré que les gènes *sn* et *m* sont régulés par Ovo dans la lignée germinale. De plus, elle a pu identifier des régions proximales du promoteur de ces gènes susceptibles d'être responsables de cette régulation. De

manière intéressante, les promoteurs de sn et m contiennent des clusters de motif Ovo/Svb. Dans la lignée germinale, la protéine Ovo semble donc privilégier l'utilisation des CRMs composés par un clustering homotypique de sites de liaison, comme cela avait été établi pour *otu* et *ovo* (Lu and Oliver, 2001).

De nombreux points évoqués dans cette section restent à confirmer ou même entièrement à tester de manière expérimentale, néanmoins nos résultats montrent que le choix des CRM reconnus par un facteur de transcription dans un tissu dépend d'au moins trois paramètres. Un paramètre intrinsèque au facteur de transcription, sa « stabilité » d'interaction avec son motif reconnu sur l'ADN. Un paramètre dépendant du contexte chromatinien au sens large (structure de la chromatine, présence de co-facteurs, etc…). Et enfin, un paramètre particulier aux CRMs, basé sur le regroupement homotypique de sites dans un cas (Ovo) et hétérotypique dans l'autre (Svb).

3. Analyse *in vivo* des fonctions et de la régulation des protéines ZPD

Les protéines ZPD, malgré leur importance en santé humaine (maladies génétiques, surdité, cancer) et pour la zootechnie (production d'hybrides, vaccins contraceptifs) restent globalement mal comprises dans leurs fonctions et leurs mécanismes de régulation (pour revue Jovine et al, 2005). Les protéines ZPD sont généralement spécifiques des stades de différenciation terminale, pour lesquels nous ne disposons pas de modèles de cellules en culture adaptés. L'étude biophysique des protéines ZPD est de plus gênée par leur structuration tridensionnelle (établissement de ponts disulfures), et par les modifications post-traductionnelle extensives (glycosylation, syalilation, maturation…), ainsi que par leur ancrage membranaire. Des approches *in vivo* dans des systèmes modèles peuvent donc contribuer à mieux comprendre comment ces protéines ZPD fonctionnent et sont régulées.

L'objectif de ce travail était de mener une analyse fonctionnelle extensive de l'ensemble des protéines ZPD jouant un rôle au cours de la morphogenèse épidermique embryonnaire. L'analyse d'une famille de gènes paralogues constitue une voie détournée, mais néanmoins représentative des mécanismes de diversification fonctionnelle des gènes au cours de l'évolution. Précisément chez la Drosophile, il semble que cette activité évolutive duplication/divergence des gènes ZPD soit très dynamique. De plus, il existe des protéines associant au domaine ZP un second domaine fonctionnel, le domaine PAN (ou Pan-apple).

Ces deux domaines sont assez répandus mais leur présence simultanée apparait restreinte aux ecdysozoaires (incluant arthropodes et nématodes). Ces protéines pourraient alors jouer un rôle particulier au cours de la mue (ecdysis), caractéristique des animaux de cet embranchement. Parmi les *drosophilidae*, une expansion récente concernant les gènes *neyo, nyobe, morpheyus*, a été identifiée. En effet, ces trois gènes possèdent un seul ancêtre commun (et ne sont donc pas « séparés ») chez les culicidae (moustiques) ou les coléoptères (tribolium). Malgré le nombre de gènes ZPD impliqués et la proximité structurale des protéines associées, nous avons montré que la plupart des 8 gènes ZPD exercent des fonctions non redondantes dans la morphogenèse des cellules épidermiques. Dès lors, les variations de séquence entre ces 8 gènes deviennent une mine potentielle d'information concernant leurs mécanismes de spécificité fonctionnelle.

Enfin dans cette dernière section, nous nous focaliserons sur la distribution subcellulaire des protéines ZPD analysées et les conséquences potentielles de ces résultats. Nous avons vu que chaque protéine ZPD est requise pour l'interaction entre un sous-domaine spécifique de la membrane apicale et l'aECM. Nous montrons que cette activité correspond à la localisation spécifique d'une protéine ZP donnée, dans la région apicale correspondante. L'importance de ces résultats peut se résumer pour trois points.

1) Cette famille de protéines ZPD définit des sous-compartiments concentriques au sein du domaine apical. Il est possible que comme les interactions fonctionnelles entre les complexes protéiques des déterminants apicaux, qui contribuent à établir d'identité baso-latérale de la membrane cellulaire, les interactions entre protéines ZPD participent à la délimitation des sous-compartiments subapicaux.
2) La distribution subcellulaire des protéines ZPD dans les sous-domaines de la membrane apicale suggèrent l'existence de machineries d'adressage cellulaire nécessaire à cet assemblage ordonné. Nos outils (anticorps, fusion-XFP, protéines chimères) ainsi que des essais fonctionnels (sauvetage génétique) pourraient permettre de mieux comprendre les mécanismes d'adressage impliqués dans la subdivision des domaines membranaires apicaux. En effet, un crible génétique pilote est actuellement en cours au laboratoire pour identifier les régulateurs de la distribution subcellulaire des protéines ZPD. Les premiers résultats montrent la faisabilité et l'efficience de cette démarche. Là encore, il semble que seules des

approches *in vivo* soient à même de pouvoir découvrir et décrypter ces mécanismes.

3) L'existence d'une distribution subcellulaire différentielle entre les protéines ZPD modifie notre vision de la nature des polymères fibrillaires, qu'elles forment. L'analyse détaillée de la fonction des protéines ZP 1, 2 et 3 dans la *Zona Pellucida* a déjà démontré que chaque protéine joue un rôle particulier (Howes et al., 2001). Dans les cellules à trichomes, nos résultats suggèrent l'existence d'une hétérogénéité de la matrice apicale liée à la variation de sa composition en protéines ZPD.

Si la connaissance du vivant est un objectif en soi, comment les études fondamentales chez la Drosophile peuvent contribuer à lutter contre des maladies humaines ? Nous avons vu que la même mutation d'un acide aminé de la région N-terminale du domaine ZP entraine des conséquences similaires dans des processus biologiques apparemment très éloignés. Cela nous rappelle l'importance des déterminants structuraux sur la fonction des protéines. En effet, si les études chez la drosophile ne soigneront pas les surdités humaines, elles peuvent permettre de comprendre en quoi une mutation donnée va produire des effets délétères sur le processus développemental impliqué. D'autre part, j'aimerais conclure en rappelant l'extraordinaire unicité des mécanismes du vivant par delà la grande diversité de ses formes. Ainsi, la conservation de l'expression de différentes protéines ZPD entre les ovocytes des insectes et ceux des mammifères reste fascinante. C'est pourquoi, l'utilisation de nos outils pour l'analyse fonctionnelle des protéines ZPD dans la différenciation et la fécondation des œufs de drosophile, ouvre des perspectives passionnantes pour, peut-être, contribuer à mieux comprendre les mécanismes de la fécondation, et ses altérations pathologiques.

REFERENCES

A

Adams, J. C. (2004). Roles of fascin in cell adhesion and motility. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 590-6.

Aerts, S., van Helden, J., Sand, O. and Hassan, B. A. (2007). Fine-tuning enhancer models to predict transcriptional targets across multiple genomes. *PLoS ONE* **2**, e1115.

Alexandre, C., Lecourtois, M. and Vincent, J. (1999). Wingless and Hedgehog pattern Drosophila denticle belts by regulating the production of short-range signals. *Development* **126**, 5689-98.

Andrews, J., Garcia-Estefania, D., Delon, I., Lu, J., Mevel-Ninio, M., Spierer, A., Payre, F., Pauli, D. and Oliver, B. (2000). OVO transcription factors function antagonistically in the Drosophila female germline. *Development* **127**, 881-92.

Assemat, E., Bazellieres, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A. and Massey-Harroche, D. (2008). Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 614-30.

B

Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F. and Knust, E. (2001). Drosophila Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature* **414**, 638-43.

Baek, K. H. and Lee, K. Y. (1999). Signal transduction pathway for anterior-posterior development in Drosophila. *J Biomed Sci* **6**, 314-9.

Baumgartner, S., Littleton, J. T., Broadie, K., Bhat, M. A., Harbecke, R., Lengyel, J. A., Chiquet-Ehrismann, R., Prokop, A. and Bellen, H. J. (1996). A Drosophila neurexin is required for septate junction and blood-nerve barrier formation and function. *Cell* **87**, 1059-68.

Bergman, C. M., Pfeiffer, B. D., Rincon-Limas, D. E., Hoskins, R. A., Gnirke, A., Mungall, C. J., Wang, A. M., Kronmiller, B., Pacleb, J., Park, S. et al. (2002). Assessing the impact of comparative genomic sequence data on the functional annotation of the Drosophila genome. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0086.

Beronja, S. and Tepass, U. (2002). Cellular morphogenesis: slow-as-molasses accelerates polarized membrane growth. *Dev Cell* **2**, 382-4.

Bilder, D. (2003). PDZ domain polarity complexes. *Curr Biol* **13**, R661-2.

Bilder, D., Li, M. and Perrimon, N. (2000). Cooperative regulation of cell polarity and growth by Drosophila tumor suppressors. *Science* **289**, 113-6.

Bilder, D. and Perrimon, N. (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* **403**, 676-80.

Bilder, D., Schober, M. and Perrimon, N. (2003). Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nat Cell Biol* **5**, 53-8.

Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F. and Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3312-7.

Bleil, J. D. and Wassarman, P. M. (1980). Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* **20**, 873-82.

Bokel, C., Prokop, A. and Brown, N. H. (2005). Papillote and Piopio: Drosophila ZP-domain proteins required for cell adhesion to the apical extracellular matrix and microtubule organization. *J Cell Sci* **118**, 633-42.

Britten, R. J. and Davidson, E. H. (1969). Gene regulation for higher cells: a theory. *Science* **165**, 349-57.

C

Cant, K., Knowles, B. A., Mooseker, M. S. and Cooley, L. (1994). Drosophila singed, a fascin homolog, is required for actin bundle formation during oogenesis and bristle extension. *J Cell Biol* **125**, 369-80.

Carlson, E. A. (1959). Allelism, Complementation, and Pseudoallelism at the Dumpy Locus in Drosophila Melanogaster. *Genetics* **44**, 347-73.

Chanut-Delalande, H., Fernandes, I., Roch, F., Payre, F. and Plaza, S. (2006). Shavenbaby couples patterning to epidermal cell shape control. *PLoS Biol* **4**, e290.

D

Delon, I., Chanut-Delalande, H. and Payre, F. (2003). The Ovo/Shavenbaby transcription factor specifies actin remodelling during epidermal differentiation in Drosophila. *Mech Dev* **120**, 747-58.

Delon, I. and Payre, F. (2004). Evolution of larval morphology in flies: get in shape with shavenbaby. *Trends Genet* **20**, 305-13.

Deutsch, J. S. (2004). Segments and parasegments in arthropods: a functional perspective. *Bioessays* **26**, 1117-25.

DiBartolomeis, S. M., Akten, B., Genova, G., Roberts, M. A. and Jackson, F. R. (2002). Molecular analysis of the Drosophila miniature-dusky (m-dy) gene complex: m-dy mRNAs encode transmembrane proteins with similarity to C. elegans cuticulin. *Mol Genet Genomics* **267**, 564-76.

Dickinson, W. J. and Thatcher, J. W. (1997). Morphogenesis of denticles and hairs in Drosophila embryos: involvement of actin-associated proteins that also affect adult structures. *Cell Motil Cytoskeleton* **38**, 9-21.

Dobzhansky, T. (1929). A Homozygous Translocation in Drosophila Melanogaster. *Proc Natl Acad Sci U S A* **15**, 633-8.

Dubois, L., Lecourtois, M., Alexandre, C., Hirst, E. and Vincent, J. P. (2001). Regulated endocytic routing modulates wingless signaling in Drosophila embryos. *Cell* **105**, 613-24.

E

Elemento, O. and Tavazoie, S. (2005). Fast and systematic genome-wide discovery of conserved regulatory elements using a non-alignment based approach. *Genome Biol* **6**, R18.

F

Fristrom, D., Wilcox, M. and Fristrom, J. (1993). The distribution of PS integrins, laminin A and F-actin during key stages in Drosophila wing development. *Development* **117**, 509-23.

G

Garfinkel, M. D., Wang, J., Liang, Y. and Mahowald, A. P. (1994). Multiple products from the shavenbaby-ovo gene region of Drosophila melanogaster: relationship to genetic complexity. *Mol Cell Biol* **14**, 6809-18.

Greco, V., Hannus, M. and Eaton, S. (2001). Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia. *Cell* **106**, 633-45.

Greve, J. M. and Wassarman, P. M. (1985). Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J Mol Biol* **181**, 253-64.

Guild, G. M., Connelly, P. S., Ruggiero, L., Vranich, K. A. and Tilney, L. G. (2005). Actin filament bundles in Drosophila wing hairs: hairs and bristles use different strategies for assembly. *Mol Biol Cell* **16**, 3620-31.

H

Hare, E. E., Peterson, B. K., Iyer, V. N., Meier, R. and Eisen, M. B. (2008). Sepsid even-skipped enhancers are functionally conserved in Drosophila despite lack of sequence conservation. *PLoS Genet* **4**, e1000106.

Hashimoto, C., Hudson, K. L. and Anderson, K. V. (1988). The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**, 269-79.

Hatini, V. and DiNardo, S. (2001). Divide and conquer: pattern formation in Drosophila embryonic epidermis. *Trends Genet* **17**, 574-9.

Havemann, J., Muller, U., Berger, J., Schwarz, H., Gerberding, M. and Moussian, B. (2008). Cuticle differentiation in the embryo of the amphipod crustacean Parhyale hawaiensis. *Cell Tissue Res* **332**, 359-70.

Hoffmans, R. and Basler, K. (2007). BCL9-2 binds Arm/beta-catenin in a Tyr142-independent manner and requires Pygopus for its function in Wg/Wnt signaling. *Mech Dev* **124**, 59-67.

Hosaka, M., Nagahama, M., Kim, W. S., Watanabe, T., Hatsuzawa, K., Ikemizu, J., Murakami, K. and Nakayama, K. (1991). Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* **266**, 12127-30.

Howes, E., Pascall, J. C., Engel, W. and Jones, R. (2001). Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *J Cell Sci* **114**, 4127-36.

Hunter, C. and Wieschaus, E. (2000). Regulated expression of nullo is required for the formation of distinct apical and basal adherens junctions in the Drosophila blastoderm. *J Cell Biol* **150**, 391-401.

I

Inestrosa, N. C., Sunkel, C. E., Arriagada, J., Garrido, J. and Godoy-Herrera, R. (1996). Abnormal development of the locomotor activity in yellow larvae of Drosophila: a cuticular defect? *Genetica* **97**, 205-10.

Irvine, K. D. and Wieschaus, E. (1994). Cell intercalation during Drosophila germband extension and its regulation by pair-rule segmentation genes. *Development* **120**, 827-41.

J

Jackle, H. and Sauer, F. (1993). Transcriptional cascades in Drosophila. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 505-12.

Jahn, R. and Scheller, R. H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 631-43.

Jahn, R. and Sudhof, T. C. (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 863-911.

Jazwinska, A. and Affolter, M. (2004). A family of genes encoding zona pellucida (ZP) domain proteins is expressed in various epithelial tissues during Drosophila embryogenesis. *Gene Expr Patterns* **4**, 413-21.

Jazwinska, A., Ribeiro, C. and Affolter, M. (2003). Epithelial tube morphogenesis during Drosophila tracheal development requires Piopio, a luminal ZP protein. *Nat Cell Biol* **5**, 895-901.

Jovine, L., Darie, C. C., Litscher, E. S. and Wassarman, P. M. (2005). Zona pellucida domain proteins. *Annu Rev Biochem* **74**, 83-114.

Jovine, L., Janssen, W. G., Litscher, E. S. and Wassarman, P. M. (2006). The PLAC1-homology region of the ZP domain is sufficient for protein polymerisation. *BMC Biochem* **7**, 11.
Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Litscher, E. and Wassarman, P. M. (2002). The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nat Cell Biol* **4**, 457-61.
Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Litscher, E. S. and Wassarman, P. M. (2004). A duplicated motif controls assembly of zona pellucida domain proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5922-7.
Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Litscher, E. S. and Wassarman, P. M. (2007). Features that affect secretion and assembly of zona pellucida glycoproteins during mammalian oogenesis. *Soc Reprod Fertil Suppl* **63**, 187-201.

K
Kiehart, D. P., Galbraith, C. G., Edwards, K. A., Rickoll, W. L. and Montague, R. A. (2000). Multiple forces contribute to cell sheet morphogenesis for dorsal closure in Drosophila. *J Cell Biol* **149**, 471-90.
Koppen, M., Fernandez, B. G., Carvalho, L., Jacinto, A. and Heisenberg, C. P. (2006). Coordinated cell-shape changes control epithelial movement in zebrafish and Drosophila. *Development* **133**, 2671-81.

L
Laprise, P., Beronja, S., Silva-Gagliardi, N. F., Pellikka, M., Jensen, A. M., McGlade, C. J. and Tepass, U. (2006). The FERM protein Yurt is a negative regulatory component of the Crumbs complex that controls epithelial polarity and apical membrane size. *Dev Cell* **11**, 363-74.
Laprise, P., Lau, K. M., Harris, K. P., Silva-Gagliardi, N. F., Paul, S. M., Beronja, S., Beitel, G. J., McGlade, C. J. and Tepass, U. (2009). Yurt, Coracle, Neurexin IV and the Na(+),K(+)-ATPase form a novel group of epithelial polarity proteins. *Nature* **459**, 1141-5.
Lecuit, T. and Lenne, P. F. (2007). Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 633-44.
Lecuit, T., Samanta, R. and Wieschaus, E. (2002). slam encodes a developmental regulator of polarized membrane growth during cleavage of the Drosophila embryo. *Dev Cell* **2**, 425-36.
Lecuit, T. and Wieschaus, E. (2000). Polarized insertion of new membrane from a cytoplasmic reservoir during cleavage of the Drosophila embryo. *J Cell Biol* **150**, 849-60.
Legan, P. K., Rau, A., Keen, J. N. and Richardson, G. P. (1997). The mouse tectorins. Modular matrix proteins of the inner ear homologous to components of the sperm-egg adhesion system. *J Biol Chem* **272**, 8791-801.
Leptin, M. (1995). Drosophila gastrulation: from pattern formation to morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 189-212.
Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in Drosophila. *Nature* **276**, 565-70.
Locke, M., Kiss, A. and Sass, M. (1994). The cuticular localization of integument peptides from particular routing categories. *Tissue Cell* **26**, 707-34.
Lu, J., Andrews, J., Pauli, D. and Oliver, B. (1998). Drosophila OVO zinc-finger protein regulates ovo and ovarian tumor target promoters. *Dev Genes Evol* **208**, 213-22.
Lu, J. and Oliver, B. (2001). Drosophila OVO regulates ovarian tumor transcription by binding unusually near the transcription start site. *Development* **128**, 1671-86.

M

Macdonald, P. M. and Kerr, K. (1998). Mutational analysis of an RNA recognition element that mediates localization of bicoid mRNA. *Mol Cell Biol* **18**, 3788-95.

Mace, K. A., Pearson, J. C. and McGinnis, W. (2005). An epidermal barrier wound repair pathway in Drosophila is mediated by grainy head. *Science* **308**, 381-5.

Mann, R. S. and Morata, G. (2000). The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of Drosophila. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 243-71.

Manogaran, A. and Waring, G. L. (2004). The N-terminal prodomain of sV23 is essential for the assembly of a functional vitelline membrane network in Drosophila. *Dev Biol* **270**, 261-71.

Margaritis, L. H. (1985). The egg-shell of drosophila melanogaster III. Covalent crosslinking of the chorion proteins involves endogenous hydrogen peroxide. *Tissue Cell* **17**, 553-9.

Markstein, M., Pitsouli, C., Villalta, C., Celniker, S. E. and Perrimon, N. (2008). Exploiting position effects and the gypsy retrovirus insulator to engineer precisely expressed transgenes. *Nat Genet* **40**, 476-83.

McCartney, B. M., Dierick, H. A., Kirkpatrick, C., Moline, M. M., Baas, A., Peifer, M. and Bejsovec, A. (1999). Drosophila APC2 is a cytoskeletally-associated protein that regulates wingless signaling in the embryonic epidermis. *J Cell Biol* **146**, 1303-18.

Medina, E., Williams, J., Klipfell, E., Zarnescu, D., Thomas, G. and Le Bivic, A. (2002). Crumbs interacts with moesin and beta(Heavy)-spectrin in the apical membrane skeleton of Drosophila. *J Cell Biol* **158**, 941-51.

Mevel-Ninio, M., Terracol, R., Salles, C., Vincent, A. and Payre, F. (1995). ovo, a Drosophila gene required for ovarian development, is specifically expressed in the germline and shares most of its coding sequences with shavenbaby, a gene involved in embryo patterning. *Mech Dev* **49**, 83-95.

Millard, T. H. and Martin, P. (2008). Dynamic analysis of filopodial interactions during the zippering phase of Drosophila dorsal closure. *Development* **135**, 621-6.

Monne, M., Han, L., Schwend, T., Burendahl, S. and Jovine, L. (2008). Crystal structure of the ZP-N domain of ZP3 reveals the core fold of animal egg coats. *Nature* **456**, 653-7.

Morisato, D. and Anderson, K. V. (1995). Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo. *Annu Rev Genet* **29**, 371-99.

Moussian, B. (2008). The role of GlcNAc in formation and function of extracellular matrices. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **149**, 215-26.

Moussian, B., Schwarz, H., Bartoszewski, S. and Nusslein-Volhard, C. (2005). Involvement of chitin in exoskeleton morphogenesis in Drosophila melanogaster. *J Morphol* **264**, 117-30.

Moussian, B., Seifarth, C., Muller, U., Berger, J. and Schwarz, H. (2006). Cuticle differentiation during Drosophila embryogenesis. *Arthropod Struct Dev* **35**, 137-52.

Moussian, B., Veerkamp, J., Muller, U. and Schwarz, H. (2007). Assembly of the Drosophila larval exoskeleton requires controlled secretion and shaping of the apical plasma membrane. *Matrix Biol* **26**, 337-47.

Muller, H. A. and Bossinger, O. (2003). Molecular networks controlling epithelial cell polarity in development. *Mech Dev* **120**, 1231-56.

Muller, H. A. and Wieschaus, E. (1996). armadillo, bazooka, and stardust are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in Drosophila. *J Cell Biol* **134**, 149-63.

Muriel, J. M., Brannan, M., Taylor, K., Johnstone, I. L., Lithgow, G. J. and Tuckwell, D. (2003). M142.2 (cut-6), a novel Caenorhabditis elegans matrix gene important for dauer body shape. *Dev Biol* **260**, 339-51.

N

Narasimha, M., Uv, A., Krejci, A., Brown, N. H. and Bray, S. J. (2008). Grainy head promotes expression of septate junction proteins and influences epithelial morphogenesis. *J Cell Sci* **121**, 747-52.

Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. *Nature* **287**, 795-801.

O

Orr-Weaver, T. L. (1991). Drosophila chorion genes: cracking the eggshell's secrets. *Bioessays* **13**, 97-105.

Ostrowski, S., Dierick, H. A. and Bejsovec, A. (2002). Genetic control of cuticle formation during embryonic development of Drosophila melanogaster. *Genetics* **161**, 171-82.

P

Payre, F. (2004). Genetic control of epidermis differentiation in Drosophila. *Int J Dev Biol* **48**, 207-15.

Payre, F., Vincent, A. and Carreno, S. (1999). ovo/svb integrates Wingless and DER pathways to control epidermis differentiation. *Nature* **400**, 271-5.

Pielage, J., Stork, T., Bunse, I. and Klambt, C. (2003). The Drosophila cell survival gene discs lost encodes a cytoplasmic Codanin-1-like protein, not a homolog of tight junction PDZ protein Patj. *Dev Cell* **5**, 841-51.

Pollard, T. D. and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-65.

Price, M. H., Roberts, D. M., McCartney, B. M., Jezuit, E. and Peifer, M. (2006). Cytoskeletal dynamics and cell signaling during planar polarity establishment in the Drosophila embryonic denticle. *J Cell Sci* **119**, 403-15.

Prout, M., Damania, Z., Soong, J., Fristrom, D. and Fristrom, J. W. (1997). Autosomal mutations affecting adhesion between wing surfaces in Drosophila melanogaster. *Genetics* **146**, 275-85.

R

Ren, N., He, B., Stone, D., Kirakodu, S. and Adler, P. N. (2006). The shavenoid gene of Drosophila encodes a novel actin cytoskeleton interacting protein that promotes wing hair morphogenesis. *Genetics* **172**, 1643-53.

Ren, N., Zhu, C., Lee, H. and Adler, P. N. (2005). Gene expression during Drosophila wing morphogenesis and differentiation. *Genetics* **171**, 625-38.

Roch, F., Alonso, C. R. and Akam, M. (2003). Drosophila miniature and dusky encode ZP proteins required for cytoskeletal reorganisation during wing morphogenesis. *J Cell Sci* **116**, 1199-207.

S

Salles, C., Mevel-Ninio, M., Vincent, A. and Payre, F. (2002). A germline-specific splicing generates an extended ovo protein isoform required for Drosophila oogenesis. *Dev Biol* **246**, 366-76.

Sanson, B. (2001). Generating patterns from fields of cells. Examples from Drosophila segmentation. *EMBO Rep* **2**, 1083-8.

Sanson, B., Alexandre, C., Fascetti, N. and Vincent, J. P. (1999). Engrailed and hedgehog make the range of Wingless asymmetric in Drosophila embryos. *Cell* **98**, 207-16.

Santambrogio, S., Cattaneo, A., Bernascone, I., Schwend, T., Jovine, L., Bachi, A. and Rampoldi, L. (2008). Urinary uromodulin carries an intact ZP domain generated by a conserved C-terminal proteolytic cleavage. *Biochem Biophys Res Commun* **370**, 410-3.
Sapio, M. R., Hilliard, M. A., Cermola, M., Favre, R. and Bazzicalupo, P. (2005). The Zona Pellucida domain containing proteins, CUT-1, CUT-3 and CUT-5, play essential roles in the development of the larval alae in Caenorhabditis elegans. *Dev Biol* **282**, 231-45.
Schejter, E. D. and Wieschaus, E. (1993). bottleneck acts as a regulator of the microfilament network governing cellularization of the Drosophila embryo. *Cell* **75**, 373-85.
Schock, F. and Perrimon, N. (2003). Retraction of the Drosophila germ band requires cell-matrix interaction. *Genes Dev* **17**, 597-602.
Schweisguth, F., Lepesant, J. A. and Vincent, A. (1990). The serendipity alpha gene encodes a membrane-associated protein required for the cellularization of the Drosophila embryo. *Genes Dev* **4**, 922-31.
Sebastiano, M., Lassandro, F. and Bazzicalupo, P. (1991). cut-1 a Caenorhabditis elegans gene coding for a dauer-specific noncollagenous component of the cuticle. *Dev Biol* **146**, 519-30.
Sucena, E., Delon, I., Jones, I., Payre, F. and Stern, D. L. (2003). Regulatory evolution of shavenbaby/ovo underlies multiple cases of morphological parallelism. *Nature* **424**, 935-8.
Sucena, E. and Stern, D. L. (2000). Divergence of larval morphology between Drosophila sechellia and its sibling species caused by cis-regulatory evolution of ovo/shaven-baby. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4530-4.
Sugiyama, S. and Jackle, H. (1993). [Genes involved in segmentation]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **38**, 2492-504.

T
Takito, J. and Al-Awqati, Q. (2004). Conversion of ES cells to columnar epithelia by hensin and to squamous epithelia by laminin. *J Cell Biol* **166**, 1093-102.
Tanentzapf, G. and Tepass, U. (2003). Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nat Cell Biol* **5**, 46-52.
Tepass, U., Gruszynski-DeFeo, E., Haag, T. A., Omatyar, L., Torok, T. and Hartenstein, V. (1996). shotgun encodes Drosophila E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neurectoderm and other morphogenetically active epithelia. *Genes Dev* **10**, 672-85.
Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R. and Fehon, R. (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in Drosophila. *Annu Rev Genet* **35**, 747-84.
Turner, F. R. and Mahowald, A. P. (1976). Scanning electron microscopy of Drosophila embryogenesis. 1. The structure of the egg envelopes and the formation of the cellular blastoderm. *Dev Biol* **50**, 95-108.

V
Valcarcel, R., Weber, U., Jackson, D. B., Benes, V., Ansorge, W., Bohmann, D. and Mlodzik, M. (1999). Sec61beta, a subunit of the protein translocation channel, is required during Drosophila development. *J Cell Sci* **112 (Pt 23)**, 4389-96.
Vavouri, T. and Elgar, G. (2005). Prediction of cis-regulatory elements using binding site matrices--the successes, the failures and the reasons for both. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 395-402.

W

Walsh, E. P. and Brown, N. H. (1998). A screen to identify Drosophila genes required for integrin-mediated adhesion. *Genetics* **150**, 791-805.

Walters, J. W., Dilks, S. A. and DiNardo, S. (2006). Planar polarization of the denticle field in the Drosophila embryo: roles for Myosin II (zipper) and fringe. *Dev Biol* **297**, 323-39.

Waring, G. L. (2000). Morphogenesis of the eggshell in Drosophila. *Int Rev Cytol* **198**, 67-108.

Warn, R. M. and Robert-Nicoud, M. (1990). F-actin organization during the cellularization of the Drosophila embryo as revealed with a confocal laser scanning microscope. *J Cell Sci* **96 (Pt 1)**, 35-42.

Warn, R. M., Warn, A., Planques, V. and Robert-Nicoud, M. (1990). Cytokinesis in the early Drosophila embryo. *Ann N Y Acad Sci* **582**, 222-32.

Wassarman, P. M. (1988). Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem* **57**, 415-42.

Wassarman, P. M. (2008). Zona pellucida glycoproteins. *J Biol Chem* **283**, 24285-9.

Wassarman, P. M., Jovine, L. and Litscher, E. S. (2004). Mouse zona pellucida genes and glycoproteins. *Cytogenet Genome Res* **105**, 228-34.

Wieschaus, E. and Sweeton, D. (1988). Requirements for X-linked zygotic gene activity during cellularization of early Drosophila embryos. *Development* **104**, 483-93.

Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M. and Knust, E. (1995). Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of Drosophila. *Cell* **82**, 67-76.

Wulfkuhle, J. D., Petersen, N. S. and Otto, J. J. (1998). Changes in the F-actin cytoskeleton during neurosensory bristle development in Drosophila: the role of singed and forked proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* **40**, 119-32.

X

Xu, H., Boulianne, G. L. and Trimble, W. S. (2002a). Drosophila syntaxin 16 is a Q-SNARE implicated in Golgi dynamics. *J Cell Sci* **115**, 4447-55.

Xu, H., Brill, J. A., Hsien, J., McBride, R., Boulianne, G. L. and Trimble, W. S. (2002b). Syntaxin 5 is required for cytokinesis and spermatid differentiation in Drosophila. *Dev Biol* **251**, 294-306.

Z

Zanet, J., Stramer, B., Millard, T., Martin, P., Payre, F. and Plaza, S. (2009). Fascin is required for blood cell migration during Drosophila embryogenesis. *Development* **136**, 2557-65.

Zhao, M., Gold, L., Ginsberg, A. M., Liang, L. F. and Dean, J. (2002). Conserved furin cleavage site not essential for secretion and integration of ZP3 into the extracellular egg coat of transgenic mice. *Mol Cell Biol* **22**, 3111-20.

Zigmond, S. H. (2004). Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 99-105.

AUTEUR : Isabelle Fernandes

TITRE : Involment of Zona Pellucida domain proteins during epidermal cell shape changes in Drosophila embryos..

PhD SUPERVISOR : Dr Serge Plaza

PLACE AND DATE OF DEFENSE : 28 Septembre 2009 à 13h30

ABSTRACT

The Zona Pellucida Domain (ZPD) defines a conserved family of membrane-anchored matrix proteins that are as yet poorly characterized with respect to their functions during development. Using genetic approaches in flies, we show here that a set of 8 ZPD proteins is required for the localized reorganization of embryonic epidermal cells during morphogenesis. Despite varying degrees of sequence conservation, these ZPD proteins exert specific and non-redundant functions in the remodeling of epidermal cell shape. Each one accumulates in restricted sub-regions of the apical compartment, where it organizes local interactions between the membrane and the extracellular matrix. In addition, ZPD proteins are required to sculpture the actin-rich cell extensions and maintain appropriate polarization of the apical compartment. These results on ZPD proteins therefore reveal a functional sub-compartmentalization of the apical membrane and its role in the polarized control of epithelial cell shape during development.

KEY WORDS : cell morphogenesis, epidermis, extracellular matrix, polarity

---

ADMINISTRATIVE DISCIPLINE : Gènes, Cellules et Développement

Centre de Biologie du Développement
UMR 5547, Bâtiment 4R3
118, Route de Narbonne
31062 TOULOUSE CEDEX 09